



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**Estudios de tolerancia y degradación de los pesticidas clorpirifós y  
glifosato por cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* aisladas de  
suelos agrícolas**

Mic. Cecilia Soledad Carranza

DIRECTOR: Dra. Carina Elizabeth Magnoli

CO-DIRECTOR: Dra. Carla Lorena Barberis

Río Cuarto, Marzo 2018

## **COMISIÓN ASESORA**

Dra. Adriana Mabel Torres, Universidad Nacional de Río Cuarto

Dra. María Inés Medina, Universidad Nacional de Río Cuarto

Dra. Andrea Rosana Patriarca, Universidad de Buenos Aires

## **DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

Universidad Nacional de Río Cuarto 26 de marzo de 2018

Calificación.....

## **JURADO**

..... Dra. Adriana Mabel Torres

..... Dra. María Inés Medina

..... Dra. Andrea Rosana Patriarca

## RESUMEN

En nuestro país, ciertos pesticidas, tales como el glifosato y el clorpirifós son de vital importancia durante el desarrollo del cultivo de soja y maíz. Estos compuestos se incorporan en el medio ambiente del suelo de manera continua. Los microorganismos desempeñan una función de extrema importancia en los procesos biogeoquímicos del suelo, por lo tanto, la preservación de la integridad de la capacidad metabólica de la microbiota se considera un requerimiento fundamental para el mantenimiento de la calidad del suelo. La descomposición biológica generalmente se considera como el proceso más importante en la remoción del glifosato y el clorpirifós del suelo. Los hongos pueden utilizar estos compuestos como nutrientes y sustratos energéticos. Esta capacidad determina la importancia de los hongos en los procesos de biorremediación. En el presente trabajo de tesis se analizó la micobiota nativa de suelos agrícolas con y sin exposición prolongada a pesticidas, siendo las especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* una de las más frecuentes en suelos expuestos a pesticidas. Las cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi* son muy empleadas como agentes de control biológico y cada vez son más los estudios que reportan la capacidad de estas especies de degradar compuestos tóxicos. Cuatro cepas de *A. sección Flavi* no toxicogénicas fueron capaces de tolerar *in vitro* tanto concentraciones bajas como altas de glifosato y clorpirifós solos y en combinación. Particularmente, estas cepas mostraron una alta tolerancia a clorpirifós ya que no se logró reducir en un 50% el crecimiento de las mismas. Además, las cepas *A. oryzae* AM1 y AM2 lograron remover 75% de clorpirifós en un medio de cultivo sintético a 0,98 y 0,95 de  $a_w$ . En cuanto a glifosato, estas cepas fueron capaces de remover el herbicida del medio de cultivo tanto cuando el mismo se encontraba como única fuente de fósforo o nitrógeno con porcentajes de remoción mayores al 50%. Durante el proceso de remoción de estos pesticidas por *A. oryzae* AM1 se generan residuos que resultaron tóxicos para las semillas bioindicadoras ensayadas, indicando que esta cepa puede iniciar el proceso de degradación pero probablemente en la naturaleza participe en cooperación con otros microorganismos para lograr la mineralización de estos compuestos. En este trabajo se demostró que las cepas de *A. oryzae* AM1 y AM2 son capaces de tolerar diferentes concentraciones de glifosato y clorpirifós en ensayos en microcosmos de suelo tanto a condiciones óptimas de humedad como a condiciones de estrés hídrico. Ambas cepas se mantuvieron viables a lo largo de todo el período de incubación en presencia de la micobiota nativa del suelo. Dado que estos pesticidas son de uso extendido en el medio ambiente agrícola de nuestra región para el control de plagas, y cada vez se conocen más efectos perjudiciales de los mismos, es fundamental establecer estrategias tendientes a su disminución en suelo. Los resultados del presente trabajo son promisorios e incentivan a continuar estudiando la capacidad de estas cepas de degradar glifosato y clorpirifós en suelo y su potencial aplicación como agentes de biorremediación.

## ABSTRACT

Pesticides like glyphosate and chlorpyrifos play an important role during soy and maize development in Argentinian agriculture. These compounds are continuously applied on soil environment. Soil microorganisms are extremely important on soil biogeochemical processes, so the preservation of their metabolic capacity is an essential requirement for soil quality maintenance. Biological degradation is considered one of the most important processes during glyphosate and chlorpyrifos removal from soil. Fungi can use these substances both as nutrient and energy source. This capacity establishes the importance of fungi on bioremediation processes. In the present study, the native mycobiota from pesticide-exposed and pesticide-unexposed soils was analyzed. The results showed that *Aspergillus* section *Flavi* species were one of the most frequent isolates on pesticide-exposed soils. No-toxicogenic *A.* section *Flavi* species are widely used as biocontrol agents and the studies about their degradation capacity are increasing. Four *A.* section *Flavi* strains were able to tolerate *in vitro* both low and high glyphosate and chlorpyrifos concentrations alone and combined. In addition, these strains showed high chlorpyrifos tolerance due to fungal growth was not reduced up to 50%. Moreover, *A. oryzae* AM1 and AM2 removed 75% of chlorpyrifos on synthetic medium at 0.98 and 0.95 a<sub>w</sub>. Regards glyphosate, these strains were able to remove the herbicide both as the only phosphorus or nitrogen source with removal percentages over 50%. In both glyphosate and chlorpyrifos removal processes conducted by *A. oryzae* AM1 strain some residues are generated that resulted toxic for bioindicator seeds. This indicate that AM1 strain is able to start the degradation of the pesticides but it probably acts in cooperation with other degrading microorganisms to accomplish complete mineralization of these compounds. In this study, it was demonstrated that *A. oryzae* AM1 and AM2 can tolerate different glyphosate and chlorpyrifos concentrations on soil-microcosms assays both at optimal humidity and hydric stress conditions. Both fungal strains remained viable along the incubation period with native soil mycobiota presence. Since these pesticides are extensively used in the agriculture management of our region and the negative effects are being more and more knowed, it is essential to establish new strategies to reduce the impact of them. The results of the present work are promising and they encourage the study about de degradation capacity of *A. oryzae* strains on soil for potential application as bioremediation agents.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xviii
<b>Capítulo I. Micobiota cultivable de suelos agrícolas con y sin exposición a pesticidas. Identificación y caracterización de cepas de <i>Aspergillus</i> de la sección <i>Flavi</i></b>	
I.I. Introducción .....	1
I.I.1- Producción agrícola en Argentina.....	1
I.I.2- Pesticidas.....	2
I.I.2.1- Impacto de los pesticidas en los microorganismos del suelo .....	3
I.I.3. Género <i>Aspergillus</i> .....	4
I.I.3.1. Generalidades .....	4
I.I.3.2. Taxonomía e identificación del género <i>Aspergillus</i> .....	5
I.I.3.3. <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	8
I.II- Hipótesis.....	9
I.III- Objetivos.....	9
I.IV- Materiales y métodos .....	9
I.IV.1- Metodología .....	9
I.IV.1.1. Evaluación de la micobiota cultivable de suelos agrícolas expuestos y no expuestos a pesticidas.....	10
I.IV.1.1.1. Muestreo de suelo .....	10
I.IV.1.1.2. Aislamiento, recuento e identificación de la micobiota de suelo.....	11
I.IV.1.1.3. Identificación morfológica de las especies del género <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	11
I.IV.1.2. Determinación de la capacidad toxicogénica de las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	12
I.IV.1.2.1. Evaluación de la producción de AFs.....	12
I.IV.1.2.2. Evaluación de la producción de ácido ciclopiazónico (ACP) .....	13
I.IV.1.3. Identificación molecular de las especies no toxicogénicas del género <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> utilizadas en los ensayos <i>in vitro</i> .....	14
I.IV.1.3.1. Producción de biomasa fúngica y extracción de ADN.....	14
I.IV.1.3.2. Cuantificación de ADN total .....	15
I.IV.1.3.3. Reacción de PCR .....	15
I.IV.1.3.4. Purificación y secuenciación de ADN .....	16
I.IV.1.3- Análisis estadístico de los datos .....	17
I.IV.2- Materiales .....	17

I.IV-2.1. Medios de Cultivo .....	17
I.IV-2.2. Soluciones.....	18
I.V- Resultados y discusión.....	19
I.V.1- Evaluación de la micobiota cultivable de suelos agrícolas expuestos y no expuestos a pesticidas .....	19
I.V.1.1- Análisis físico químico de suelo .....	19
I.V.1.2- Evaluación de la micobiota cultivable .....	20
I.V.2- Determinación de la capacidad toxicogénica de las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	27
I.V.2.1- Evaluación de la producción de AFB <sub>1</sub> y ACP .....	27
I.V.3- Selección de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> no toxicogénicas para futuros ensayos de tolerancia y remoción de glifosato y clorpirifós .....	29
I.V.4- Identificación molecular de las especies no toxicogénicas del género <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> utilizadas en los ensayos <i>in vitro</i> .....	31
I.VI- Conclusiones.....	33

## **Capítulo II. Tolerancia *in vitro* a glifosato y clorpirifós solos y en combinación por *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones ambientales**

II.I- Introducción .....	34
II.I.1- Pesticidas más usados en Argentina.....	34
II.I.1.1- Glifosato .....	34
II.I.1.1.1- Generalidades .....	34
II.I.1.1.2- Dosis aplicadas.....	34
II.I.1.1.3- Mecanismo de acción .....	35
II.I.1.1.4- Comportamiento y persistencia del glifosato en el suelo .....	35
II.I.1.2- Clorpirifós .....	37
II.I.1.2.1- Generalidades .....	37
II.I.1.2.2- Dosis aplicadas.....	38
II.I.1.2.3- Mecanismo de acción .....	38
II.I.1.2.4- Comportamiento y persistencia en el suelo.....	38
II.II- Hipótesis.....	40
II.III- Objetivos.....	40
II.IV- Materiales y métodos .....	40
II.IV.1- Metodología .....	40
II.IV.1.1- Ensayos de tolerancia a glifosato .....	40
II.IV.1.1.1- En medio agar extracto de suelo (AES) .....	40
II.IV.1.1.2- En medio a base de sustrato .....	41

II.IV.1.1.3- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno .....	42
II.IV.1.2- Ensayos de tolerancia a clorpirifós .....	42
II.IV.1.2.1- En medio agar extracto de suelo (AES) .....	42
II.IV.1.2.2- En medio a base de sustrato .....	42
II.IV.1.2.3. Evaluación de la capacidad de utilizar clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno .....	43
II.IV.1.3- Evaluación <i>in vitro</i> de la tolerancia a diferentes dosis combinadas de glifosato y clorpirifós por cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> no toxicogénicas en medio a base de sustrato.....	43
II.IV.1.4- Análisis estadístico de los datos .....	44
II.V- Resultados y discusión .....	45
II.V.1- Evaluación <i>in vitro</i> de la tolerancia a glifosato y clorpirifós solos y en combinación por <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> bajo diferentes condiciones de incubación.....	45
II.V.1.1- Ensayos de tolerancia a glifosato .....	45
II.V.1.1.1- En medio agar extracto de suelo (AES) .....	45
II.V.1.1.2- En medio a base de sustrato .....	49
II.V.1.1.3- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno .....	53
II.V.1.1.3.1- Características macroscópicas de las colonias en los medios suplementados con glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno .....	56
II.V.1.2- Ensayos de tolerancia a clorpirifós .....	61
II.V.1.2.1- En medio AES .....	61
II.V.1.2.2. En medio base de sustrato .....	65
II.V.1.2.3- Evaluación de la capacidad de utilizar clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno .....	69
II.V.1.2.3.1- Características macroscópicas de las colonias en los medios suplementados con clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno .....	72
II.V.1.2- Evaluación <i>in vitro</i> de la tolerancia a diferentes dosis combinadas de glifosato y clorpirifós por cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> no toxicogénicas en medio AESO	79
II.VI- Conclusiones.....	88

### **Capítulo III. Remoción de glifosato y clorpirifós *in vitro* por *A. oryzae*. Tolerancia a glifosato y clorpirifós por *A. oryzae* en microcosmos de suelo agrícola**

III.I- Introducción .....	90
III.I.1- Efecto de la aplicación de pesticidas en las comunidades microbianas del suelo	90
III.I.2- Degradación de glifosato y clorpirifós en suelo.....	92
III.I.2.2- Degradación del glifosato en el suelo .....	92
III.I.2.3- Degradación del clorpirifós en el suelo .....	94

III.II- Hipótesis.....	96
III.III- Objetivos.....	96
III.IV- Materiales y métodos .....	97
III.IV.1- Metodología.....	97
III.IV.1.1- Evaluación de la remoción <i>in vitro</i> de glifosato por <i>A. oryzae</i> en medio sintético .....	97
III.IV.1.1.1- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como fuente única de fósforo y nitrógeno.....	97
III.IV.1.1.2. Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como única fuente de fósforo en altas concentraciones .....	98
III.IV.1.1.3- Extracción y detección de glifosato del medio de cultivo.....	98
III.IV.1.1.4- Evaluación de la fitotoxicidad de los productos de degradación de glifosato por la cepa de <i>A. oryzae</i> AM1 .....	99
III.IV.1.2- Evaluación <i>in vitro</i> de la remoción de clorpirifós por <i>A. oryzae</i> en medio sintético .....	100
III.IV.1.2.1- Extracción y detección de clorpirifós.....	100
III.IV.1.2.2- Evaluación de la fitotoxicidad de los productos de degradación de clorpirifós por la cepa de <i>A. oryzae</i> AM1 .....	101
III.IV.1.3- Evaluación <i>in situ</i> de la tolerancia a glifosato y clorpirifós por cepas de <i>A. oryzae</i> no toxicogénicas previamente seleccionadas en presencia de la micobiota nativa .....	102
III.IV.1.3.1- Preparación y acondicionamiento de los microcosmos.....	102
III.IV.1.3.2- Inoculación de los microcosmos .....	103
III.IV.1.3.2- Aislamiento, recuento e identificación de la micobiota de los microcosmos .....	104
III.IV.1.4- Análisis estadístico de los datos .....	105
III.IV.2- Materiales .....	105
III.IV.2.1- Medios de cultivo.....	105
III.IV.2.2- Soluciones.....	105
III.V- Resultados y discusión.....	106
III.V.1- Evaluación de la remoción <i>in vitro</i> de glifosato y clorpirifós por <i>A. oryzae</i> en medio sintético .....	106
III.V.1.1- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como única fuente de fósforo y nitrógeno.....	106
III.V.1.2- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como única fuente de fósforo en altas concentraciones .....	108
III.V.1.3- Evaluación de la fitotoxicidad de los productos de degradación de glifosato por la cepa <i>A. oryzae</i> AM1 .....	110
III.V.2- Evaluación <i>in vitro</i> de la remoción de clorpirifós por <i>A. oryzae</i> en medio sintético.....	111
III.V.2.1- Evaluación de la fitotoxicidad de los productos de degradación de clorpirifós por la cepa <i>A. oryzae</i> AM1 .....	114



III.V.3- Evaluación <i>in situ</i> de la tolerancia a glifosato y clorpirifós por cepas de <i>A. oryzae</i> previamente seleccionadas en presencia de la micobiota nativa.....	119
III.V.3.1- Evaluación <i>in situ</i> de tolerancia a glifosato de la micobiota nativa aislada de suelos destinados al cultivo de soja y maíz.....	119
III.V.3.1.1- Evaluación <i>in situ</i> de la tolerancia a glifosato por <i>A. oryzae</i> AM1, en presencia de la micobiota nativa .....	126
III.V.4.2.1- Evaluación <i>in situ</i> de la tolerancia a glifosato por <i>A. oryzae</i> AM2, en presencia de la micobiota nativa .....	133
III.V.3.2- Evaluación <i>in situ</i> de tolerancia a clorpirifós de la micobiota nativa aislada de suelos destinados al cultivo de soja y maíz.....	139
III.V.3.2.1- Evaluación <i>in situ</i> de la tolerancia a clorpirifós por <i>A. oryzae</i> AM1, en presencia de la micobiota nativa .....	148
III.V.3.2.2- Evaluación <i>in situ</i> de la tolerancia a clorpirifós por <i>A. oryzae</i> AM2, en presencia de la micobiota nativa .....	155
III.VI- Conclusiones.....	164

#### **Capítulo IV. Conclusiones finales y perspectivas futuras**

IV.I- Conclusiones finales .....	166
IV.II- Perspectivas futuras .....	167

#### **Capítulo V. Bibliografía**

V. Bibliografía .....	168
-----------------------	-----

ANEXO ESTADÍSTICO .....	180
-------------------------	-----

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clasificación del género <i>Aspergillus</i> (Houbraken y col., 2014).....	6
<b>Tabla 2:</b> Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los genes calmodulina y $\beta$ -tubulina.....	16
<b>Tabla 3:</b> Características físico-químicas de los suelos analizados.....	19
<b>Tabla 4:</b> Producción de AFB <sub>1</sub> y ACP por cepas de <i>A. sección Flavi</i> aisladas de suelo agrícola expuesto a pesticidas.....	28
<b>Tabla 5:</b> Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la fase de latencia (hs) de <i>A. sección Flavi</i> (AM1; AM2; GM3; GM4) en el medio AES bajo diferentes condiciones de MPa y a 25 °C.....	48
<b>Tabla 6:</b> Análisis de la varianza del efecto del potencial hídrico (MPa), concentración de glifosato (C), diferentes cepas (I) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de <i>A. sección Flavi</i> sobre el medio agar extracto de suelo.....	49
<b>Tabla 7:</b> Efectos de diferentes concentraciones de glifosato sobre la fase de latencia (hs) de <i>A. sección Flavi</i> (AM1; AM2; GM3 y GM4) en el medio AESO bajo diferentes condiciones de $a_w$ y a 25 °C.....	52
<b>Tabla 8:</b> Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C), diferentes cepas (I), y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de <i>A. sección Flavi</i> sobre un medio agar extracto de soja.....	53
<b>Tabla 9:</b> Fase de latencia (hs) de cepas no toxicogénicas de <i>A. sección Flavi</i> en medios de cultivo sin glifosato y adicionados con el pesticida como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno.....	55
<b>Tabla 10:</b> Análisis de la varianza del efecto de los medios de cultivo (M) y diferentes cepas (I), y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de <i>A. sección Flavi</i> en diferentes medios adicionados con glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno.....	55
<b>Tabla 11:</b> Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la fase de latencia (hs) de <i>A. sección Flavi</i> (AM1; AM2; GM3; GM4) en el medio AES bajo diferentes condiciones de MPa y a 25 °C.....	64
<b>Tabla 12:</b> Análisis de la varianza del efecto del potencial hídrico (MPa), concentración de clorpirifós (C), diferentes cepas (I) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de <i>A. sección Flavi</i> sobre un medio agar extracto de suelo.....	65
<b>Tabla 13:</b> Efectos de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la fase de latencia (hs) de <i>A. sección Flavi</i> (AM1; AM2; GM3 y GM4) en el medio AESO bajo diferentes condiciones de $a_w$ y a 25°C.....	68

<b>Tabla 14:</b> Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C), diferentes cepas (I) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de <i>A. sección Flavi</i> sobre agar extracto de soja.....	69
<b>Tabla 15:</b> Fase de latencia (hs) de cepas no toxicogénicas de <i>A. sección Flavi</i> en medios de cultivo adicionados con clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno y medios controles.....	71
<b>Tabla 16:</b> Análisis de la varianza del efecto de los medios de cultivo (M) y diferentes cepas (I), y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de <i>A. sección Flavi</i> en diferentes medios adicionados con clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno.....	72
<b>Tabla 17:</b> Efecto de diferentes concentraciones de glifosato y clorpirifós sobre la fase de latencia (hs) de <i>A. sección Flavi</i> (AM1; AM2; GM3 y GM4) en el medio AESO bajo diferentes condiciones de $a_w$ y a 25°C.....	84
<b>Tabla 18:</b> Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ) y los tratamientos (T) y su interacción sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de <i>A. sección Flavi</i> en el AESO.....	86
<b>Tabla 19:</b> Análisis de la varianza de la remoción del glifosato en los distintos medios de cultivo por las cepas de <i>A. oryzae</i> .....	108
<b>Tabla 20:</b> Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de pesticidas (C), diferentes aislados (I) y sus interacciones en los porcentajes de remoción del clorpirifós por cepas de <i>A. oryzae</i> .....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principales zonas agrícolas de Argentina según el PAS (Bolsa de Cereales, 2017).....	2
<b>Figura 2:</b> Características morfológicas consideradas para la clasificación de las especies del género <i>Aspergillus</i> (Abarca, 2000).....	7
<b>Figura 3:</b> Esquema de inoculación para la identificación de especies del género <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	12
<b>Figura 4:</b> Logaritmo del recuento fúngico total de los diferentes sitios de muestreo de un suelo agrícola expuesto a pesticidas en 8 períodos de muestreo.....	21
<b>Figura 5:</b> Distribución de los géneros fúngicos aislados en las muestras de un suelo agrícola expuesto a pesticidas.....	22
<b>Figura 6:</b> Distribución de los géneros fúngicos aislados en las muestras de un suelo agrícola sin exposición prolongada a pesticidas.....	23
<b>Figura 7:</b> Distribución de la microbiota cultivable en el medio DRBC a los 7 días de incubación, en muestras de suelo expuestas a glifosato en el período diciembre de 2013, dilución $10^{-2}$ y dilución $10^{-3}$ (A) y en muestras de suelo sin exposición a pesticidas dilución $10^{-2}$ y dilución $10^{-3}$ (B).....	24
<b>Figura 8:</b> Distribución de los géneros fúngicos aislados en las muestras de un suelo agrícola expuesto a pesticidas de acuerdo a los períodos muestreados.....	26
<b>Figura 9:</b> Cromatoplaqueta mostrando la coloración violeta del ACP luego de rociar la placa con p- dimetilaminobenzaldehído confirmando la producción de la toxina.....	29
<b>Figura 10:</b> Amplificación de los genes calmodulina (A) con los cebadores CL1/CL2A y $\beta$ -tubulina (B) con los cebadores Bt2a/Bt2b de algunas de las cepas no toxicogénicas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> utilizadas en los ensayos <i>in vitro</i> . Línea C (-): control negativo sin ADN, M: Marcador de peso molecular (Marcador DNA Ladder Bio Labs New England Inc.).....	31
<b>Figura 11:</b> Estructura química del glifosato.....	34
<b>Figura 12:</b> Estructura química del clorpirifós.....	38
<b>Figura 13:</b> Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial de <i>A. sección Flavi</i> : cepa AM1 (A); AM2 (B); GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AES bajo distintos valores de MPa.....	46
<b>Figura 14:</b> Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial de <i>A. sección Flavi</i> : cepa AM1 (A); AM2 (B); GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AESO bajo distintas condiciones de $a_w$ .....	51
<b>Figura 15:</b> Efecto del adición de glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno sobre la velocidad de crecimiento de cepas no toxicogénicas de <i>A. sección Flavi</i> .....	54

<b>Figura 16:</b> Efecto de la adición de glifosato como fuente de carbono (CZC), fósforo (CZP) y nitrógeno (CZN) sobre la morfología de la colonia de <i>A. oryzae</i> GM3 (A). Características morfológicas de la las colonias de <i>A. oryzae</i> AM2 desarrolladas en el medio agar Czapeck (CZ) y en agar agua (AA) (B).....	57
<b>Figura 17:</b> Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial de <i>A. sección Flavi</i> : cepa AM1 (A); AM2 (B); GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AES bajo distintos valores de MPa.....	62
<b>Figura 18:</b> Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial de <i>A. sección Flavi</i> : cepa AM1 (A); AM2 (B); GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AESO bajo distintas condiciones de $a_w$ .....	67
<b>Figura 19:</b> Efecto del agregado de clorpirifós al medio CZ como fuente de carbono (CZC), fósforo (CZP) y nitrógeno (CZN) sobre la velocidad de crecimiento de cepas no toxicogénicas de <i>A. sección Flavi</i> . Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) de acuerdo al test LSD. AA: agar agua.....	70
<b>Figura 20:</b> Características morfológicas de las colonias de <i>A. oryzae</i> AM2 desarrolladas en el medio CZ con el agregado de clorpirifós como fuente de carbono (CZC), fósforo (CZP) y nitrógeno (CZN).....	73
<b>Figura 21:</b> Características morfológicas de las colonias de <i>A. oryzae</i> AM2 desarrolladas en el medio agar Czapeck (CZ) y en agar agua (AA).....	73
<b>Figura 22:</b> Efecto de las distintas combinaciones de glifosato y clorpirifós en la velocidad de crecimiento (mm/día) de cepas de <i>A. sección Flavi</i> AM1 (A), AM2 (B), GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AESO a 25°C.....	82
<b>Figura 23.</b> Vías de degradación del glifosato (Huang y col. 2016).....	93
<b>Figura 24:</b> Vías de degradación del clorpirifós (Yadav y col. 2015).....	95
<b>Figura 25:</b> Esquema de acondicionamiento, inoculación e incubación del ensayo en microcosmos.....	104
<b>Figura 26:</b> Remoción de glifosato en caldo Czapeck con glifosato como única fuente de fósforo (CZP) o nitrógeno (CZN) a 28°C por <i>A. oryzae</i> AM1 (A) y AM2 (B).....	107
<b>Figura 27:</b> Remoción de glifosato por <i>A. oryzae</i> AM1 en caldo Czapeck con glifosato como única fuente de fósforo en altas concentraciones (10 mM) y acondicionado a 0,99, 0,98 y 0,95 de $a_w$ .....	109
<b>Figura 28:</b> Remoción de glifosato por <i>A. oryzae</i> AM1 en caldo Czapeck con glifosato como única fuente de fósforo (10 mM).....	110
<b>Figura 29:</b> Porcentaje de germinación (barras) e índice de vigor (IV) (líneas) de semillas de lechuga cultivadas en extracto de medio de cultivo CZ con glifosato como fuente de fósforo (CZP) y nitrógeno (CZN) del ensayo de remoción con la cepa <i>A. oryzae</i> AM1.....	111

<b>Figura 30:</b> Remoción de clorpirifós en caldo Czapeck (CZ) acondicionado a 0,98; 0,95 y 0,93 de $a_w$ por cepas de <i>A. oryzae</i> AM1 (A) y AM2 (B).....	113
<b>Figura 31:</b> Porcentaje de germinación (barras) e índice de vigor (IV) (líneas) de semillas de lechuga cultivadas en extracto de medio de cultivo Czapeck con tres concentraciones de clorpirifós como fuente de carbono (5, 10 y 20 mM) del ensayo de remoción con la cepa <i>A. oryzae</i> AM1.....	115
<b>Figura 32:</b> Recuento fúngico total ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC en los ensayos control y con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (A) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (B).....	120
<b>Figura 33:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de los principales géneros fúngicos aislados de los microcosmos al día 1 de incubación acondicionados a 70 (A) y 30 (B) CC y adicionados con diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM).....	122
<b>Figura 34:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Trichoderma</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC y con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM).....	123
<b>Figura 35:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Aspergillus</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM).....	124
<b>Figura 36:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Penicillium</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM).....	125
<b>Figura 37:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Mucor</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM).....	126
<b>Figura 38:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM1 aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (A) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (B).....	128
<b>Figura 39:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM1 y la microbiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 70 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (A) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (B).....	130

<b>Figura 40:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM1 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a <b>30</b> CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento ( <b>A</b> ) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento ( <b>B</b> ). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E. $\pm 0,05$ ).....	132
<b>Figura 41:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM2 de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento ( <b>A</b> ) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento ( <b>B</b> ).....	134
<b>Figura 42:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM2 y la micobiota nativa de microcosmos acondicionados a <b>70</b> CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento ( <b>A</b> ) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento ( <b>B</b> ).....	136
<b>Figura 43:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM2 y la micobiota nativa de microcosmos acondicionados a <b>30</b> CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento ( <b>A</b> ) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento ( <b>B</b> ).....	138
<b>Figura 44:</b> Recuento fúngico total ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC en los ensayos control y bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento ( <b>A</b> ) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento ( <b>B</b> ).....	140
<b>Figura 45:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de los principales géneros fúngicos aislados de los microcosmos al día 1 de incubación acondicionados a 70 ( <b>A</b> ) y 30 ( <b>B</b> ) CC y adicionados con diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM).....	142
<b>Figura 46:</b> Distribución de la micobiota de los microcosmos en el medio DRBC a los 10 días de incubación. En <b>a</b> y <b>b</b> control y tratamiento a 70 CC; en <b>c</b> y <b>d</b> control y tratamiento a 30 CC, respectivamente.....	143
<b>Figura 47:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Trichoderma</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM).....	144
<b>Figura 48:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Aspergillus</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM).....	145

<b>Figura 49:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Penicillium</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM).....	146
<b>Figura 50:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Cladosporium</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM).....	147
<b>Figura 51:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>Fusarium</i> spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM).....	148
<b>Figura 52:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM1 aislada de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (A) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (B).....	149
<b>Figura 53:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM1 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 70 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (A) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (B).....	151
<b>Figura 54:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM1 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (A) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (B).....	153
<b>Figura 55:</b> Distribución de la cepa <i>A. oryzae</i> AM1 y la micobiota nativa de los microcosmos en el medio DRBC a los 10 días de incubación. En a y b control y tratamiento a 70 CC; en c y d control y tratamiento a 30 CC, respectivamente.....	154
<b>Figura 56:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM2 de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (A) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (B).....	156
<b>Figura 57:</b> Recuento ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g) de <i>A. oryzae</i> AM2 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 70 CC con la adición de diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (A) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (B).....	158



**Figura 58:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *A. oryzae* AM2 y la microbiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a **30** CC con la adición de diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento **(A)** y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento **(B)**.....160

## ABREVIATURAS

PAS	Panorama Agrícola Semanal
AEM	Agar extracto de malta
CYA	Agar Czapek extracto de levadura
G25N	Agar nitrato glicerol al 25%
CY20S	Agar Czapek extracto de levadura sacarosa al 20%
CREA	Agar creatina sacarosa
AFs	Aflatoxinas
ACP	Ácido ciclopiazónico
ARN	Ácido ribonucleico
ITS	Espaciador transcripto interno
L	Litros
ha	Hectáreas
kg	Kilogramo
g	Gramo
mm	Milímetros
°C	Grado centígrado
°	Grados
'	Minutos
latitud S	Latitud sur
longitud O	Longitud oeste
m	Metros
mL	Mililitros
rpm	Revoluciones por minuto
DRBC	Agar diclorán rosa de bengala cloranfenicol
mM	Milimolar
UFC	Unidades formadoras de colonias
μL	Microlitros

N <sub>2</sub>	Nitrógeno
TLC	Cromatografía en capa delgada
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
v	Volúmen
cm	Centímetros
UV	Ultravioleta
nm	Nanómetros
HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión
YES	Agar extracto de levadura sacarosa
min	Minutos
d.i.	Diámetro interno
μm	Micrómetros
ng	Nanogramos
hs	Horas
Rf	Relación de frente
μg	Microgramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
TE	Tris-ácido etilendiaminotetraacético
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Tris-HCl	Tris ácido clorhídrico
μM	Micromolar
seg	Segundos
pb	Pares de bases
LSD	Prueba de Fisher

M	Molar
ppm	Partes por millón
d/S	Decisiemens
cmol	Centimol
spp.	Especies
CIC	Capacidad de intercambio de cationes
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
EPSPS	3-enolpiruvil-siquimato-5-fosfato sintetasa
col.	Colaboradores
mg	Miligramos
AES	Agar extracto de suelo
MPa	Potencial hídrico
CES	Caldo extracto de suelo
AESO	Agar extracto de soja
$a_w$	Actividad acuosa
DL50	Dosis letal 50
CZ	Agar Czapeck
CZC	Agar Czapeck con pesticidas como fuente de carbono
CZP	Agar Czapeck con pesticidas como fuente de fósforo
CZN	Agar Czapeck con pesticidas como fuente de nitrógeno
DE	Desvío estándar
AA	Agar agua
TCP	3,5,6-tricloro-2-piridinol
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
FMOCl	9-fluorenylmethyl cloroformato
UPLC	Cromatografía líquida de ultra precisión
MS/MS	Espectrometría masa/masa
IV	Índice de vigor
CC	Capacidad de campo

$P_{SH}$	Peso suelo húmedo
$P_{SS}$	Peso suelo seco
E.E.	Error estándar

# **CAPÍTULO I**

## **Capítulo I. Micobiota cultivable de suelos agrícolas con y sin exposición a pesticidas. Identificación y caracterización de cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi***

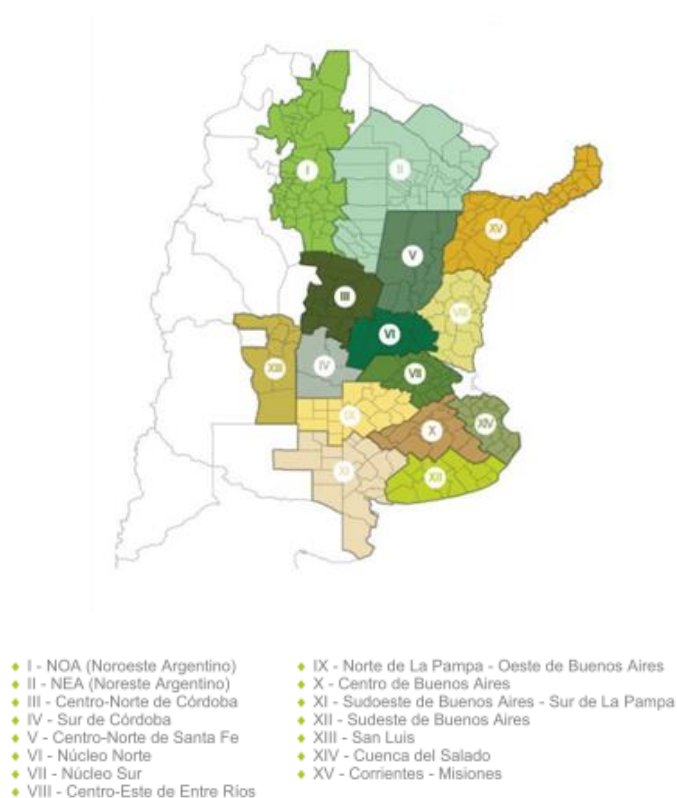
### **I.I. Introducción**

#### **I.I.1- Producción agrícola en Argentina**

En Argentina, el área sembrada durante el año 2017 alcanzó los 39 millones de hectáreas siendo los principales cultivos el grupo de cereales, principalmente maíz, trigo, avena, cebada y sorgo; oleaginosas, como la soja y el girasol; y otros cultivos de menor magnitud, pero con gran importancia como el algodón y el maní (Ministerio de agroindustria 2017). Las principales zonas agrícolas se encuentran clasificadas en 15 zonas según el Panorama Agrícola Semanal (PAS) de la Bolsa de Cereales como se muestra en la **figura 1** (Bolsa de Cereales 2017)

La producción de soja es una de las principales fuentes económicas del país, habiendo alcanzado en la campaña 2016/2017, una superficie sembrada de 19,2 millones de hectáreas. Las principales áreas productoras son las provincias de Córdoba, Santa Fe y el norte de Buenos Aires, junto con las zonas secundarias de las provincias de Salta, Tucumán y Santiago del Estero (Bolsa de cereales 2017). Para la campaña actual, se estima una producción de 56,5 millones de toneladas, ubicando al país, como tercer productor mundial, después de Estados Unidos y Brasil (INTA 2017). Además del grano, Argentina se ubica como primer exportador mundial de aceite y harina de soja y primer productor mundial de biodiesel en base al aceite de soja, obteniendo así una mayor expansión en el mercado internacional y gran relevancia económica que se mantiene en aumento durante los últimos años (Bolsa de comercio de Rosario 2016).

En cuanto a la producción de maíz, se espera alcanzar para la campaña actual las 37 millones de toneladas, el segundo gran aporte económico para el país. La superficie sembrada en 2017 fue de 4,9 millones de hectáreas, distribuido en las principales áreas productoras en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos, junto con otras áreas secundarias como lo son parte de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Formosa. Para este cereal, Argentina es el segundo exportador a nivel mundial después de los Estados Unidos (Bolsa de cereales 2017).



**Figura 1:** Principales zonas agrícolas de Argentina según el PAS (Bolsa de Cereales 2017)

### I.1.2- Pesticidas

Los pesticidas, plaguicidas o agroquímicos son sustancias químicas o mezclas de sustancias destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas. Dentro de la denominación plaga se incluyen insectos, hierbas, pájaros, mamíferos, moluscos, peces, nemátodos o microbios que compiten con los humanos para conseguir alimentos. Los pesticidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos. Si se tienen en cuenta los utilizados de forma masiva: plaguicidas de uso fitosanitario y de uso ganadero; según su acción específica pueden ser clasificados como insecticida, acaricida, fungicida, bactericida, herbicida, fitoregulator, rodenticida y productos afines; y según su constitución química pueden clasificarse en varios grupos siendo los más importantes los arsenicales, carbamatos, dinitrocompuestos, organoclorados, organofosforados y triazinas, entre otros (EPA 2007).

En nuestro país, ciertos pesticidas, tales como clorpirifos, glifosato y diclosulám son de vital importancia durante el desarrollo del cultivo de soja y maní, incorporándose en forma continua en el medio ambiente del suelo destinado al cultivo de estas oleaginosas. En el



cultivo de maíz los pesticidas más usados son glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y atrazina (INTA 2015).

El uso de glifosato es especialmente indicado para el control de las malezas presentes en el rastrojo del cultivo anterior, antes o inmediatamente después de la implementación de la siembra directa. Se recomienda esperar 2 a 3 días después de la cosecha para que las malezas recuperen la capacidad de absorber el herbicida y luego aplicar 2,5 L/ha del herbicida (Monsanto 2015).

### **I.1.2.1- Impacto de los pesticidas en los microorganismos del suelo**

Los pesticidas, de uso extensivo en la agricultura, ocupan un lugar importante dentro de las sustancias a las que el hombre está expuesto. Desde los años 70, se cuenta con datos sobre el impacto ambiental, en los alimentos y en la salud humana en el país. La economía argentina se basa tradicionalmente en la producción agrícola; esto trae aparejado la aplicación de significativas cantidades de plaguicidas que impactan sobre la salud y la calidad del ambiente (Villamil-Lepori y col. 2013).

Los microorganismos desempeñan una función de extrema importancia en los procesos biogeoquímicos del suelo, a pesar de ocupar menos del 1% de su volumen. La microbiota del suelo es responsable de la ejecución y el control de funciones esenciales tales como: la descomposición de la materia orgánica, la producción de humus, la fijación de nitrógeno atmosférico, la producción de compuestos complejos que causan la agregación del suelo, la descomposición de xenobióticos y el control biológico de plagas y enfermedades, entre otros (Andrea y Pettinelli 2000; Moreira y Siquiera 2002). La preservación de la integridad de la capacidad metabólica de la microbiota se considera un requerimiento fundamental para el mantenimiento de la calidad del suelo (Girvan y col. 2004).

Las actividades humanas afectan tanto el tamaño como la estructura de la población microbiana del suelo, entre los que se encuentran los hongos. Numerosas actividades como la agricultura, desorganizan largas extensiones de vegetación y suelo provocando una redistribución de los propágulos fúngicos y generando nuevas fuentes nutritivas para los hongos. Esto resulta en la asociación de bastas poblaciones de hongos con diversas actividades relacionadas con la agricultura. Durante el desarrollo de los cultivos o en la producción animal, los hongos colonizan diferentes sustratos e influyen, tanto directamente como a través de sus metabolitos, la salud y economía de la población humana y animal (Pitt y Hocking 2009).

En tal sentido está comprobado que las prácticas de manejo asociadas a la intensificación de la agricultura y, en particular, las asociadas al uso de pesticidas pueden alterar intensamente la funcionalidad de la microbiota por su influencia tanto en la cantidad como en la actividad de los microorganismos del suelo. Estos exhiben en general una gran adaptabilidad en respuesta al impacto causado por los xenobióticos, que es evidenciada por el restablecimiento de la actividad metabólica. Los mecanismos por los cuales esto puede suceder, involucran el desplazamiento de especies sensibles por otras tolerantes o por una rápida recolonización del ambiente luego de la aplicación del pesticida (Araujo y col. 2003; Girvan y col. 2004).

El uso de herbicidas es un factor importante en la agricultura actual, constituyendo una práctica esencial y generalizada. Por esta razón, el control de malezas constituye uno de los principales factores antropogénicos con potencialidad de alterar la microbiota de los suelos agrícolas (Sannino y Gianfreda 2001). Los estudios desarrollados en las últimas décadas señalan una amplia variabilidad de efectos de los herbicidas sobre los microorganismos del suelo (Damalas y Eleftherohorinos 2011)

La importancia de la actividad microbiana en el reciclaje de la materia orgánica y en la regulación del pool de nutrientes, sugiere que los efectos del estrés sobre la microbiota del suelo están fuertemente relacionados con los efectos en el cultivo, en la vegetación natural y en la productividad del ecosistema (Mariyono 2008). El uso repetido de herbicidas del mismo grupo químico por extensos períodos, sin considerar los intervalos requeridos para la debida recuperación de la funcionalidad de la microbiota del suelo, puede desencadenar alteraciones de difícil reversibilidad (Way y Van Emden 2000).

La actividad de los microorganismos en los suelos es la principal determinante de la degradación de los herbicidas. De la misma, depende básicamente tanto la tasa como el grado en que los herbicidas son degradados. En condiciones reales, los efectos sobre la microbiota presentan gran variabilidad en función de la naturaleza química del herbicida, la dosis, momento y forma de aplicación, tipo de suelo, cultivo establecido y manejos culturales, pudiendo alterar fuertemente las respuestas de la misma (Fernandez 2007).

### **I.1-3. Género *Aspergillus***

#### **I.1-3.1. Generalidades**

Las especies de *Aspergillus*, se consideran entre los organismos de más amplia distribución cosmopolita, capaces de colonizar una gran variedad de sustratos en los

diferentes nichos ecológicos del suelo; en general, son frecuentes en climas tropicales y subtropicales pero disminuyen en los climas fríos, mientras algunas especies son restringidas a hábitats específicos. Se consideran contaminantes comunes de varios substratos, en especial alimentos, granos, suelos (salinos, cultivados, desérticos y de pastoreo), bosques subtropicales deciduos y ambientes internos, entre otros (CAST 2003; Pitt y Hocking 2009). Es uno de los géneros fúngicos con mayor importancia económica en la biotecnología (enzimas, ácidos orgánicos, metabolitos bioactivos), pero los miembros del género también son frecuentemente reportados como contaminantes transmitidos por los alimentos (descomposición de alimentos y contaminación por micotoxinas), o como agentes causales de micosis en humanos (aspergilosis pulmonar, otomicosis y queratitis) (Houbraken y Samson 2011; Pitt y Taylor 2014).

Algunas especies del género han sido reportadas como productoras de enzimas de gran importancia industrial, entre las cuales se pueden destacar, invertasas (en la elaboración de confites y edulcorantes artificiales), fitasas, celulasas y proteasas (utilizadas para la degradación de compuestos complejos para su uso en alimentos) muy utilizadas en la industria alimenticia (Costa y col. 2010; Veana y col. 2011). Otros estudios evaluaron el rol de *Aspergillus niger* como importante productor de ácido cítrico, utilizado industrialmente como conservante y antioxidante natural (Niu y col. 2015; Li y col. 2016). Las investigaciones de los últimos años muestran el rol de las diferentes especies de *Aspergillus* en la industria y biotecnología, con creciente desarrollo en su uso (Torres y Osorio 2012).

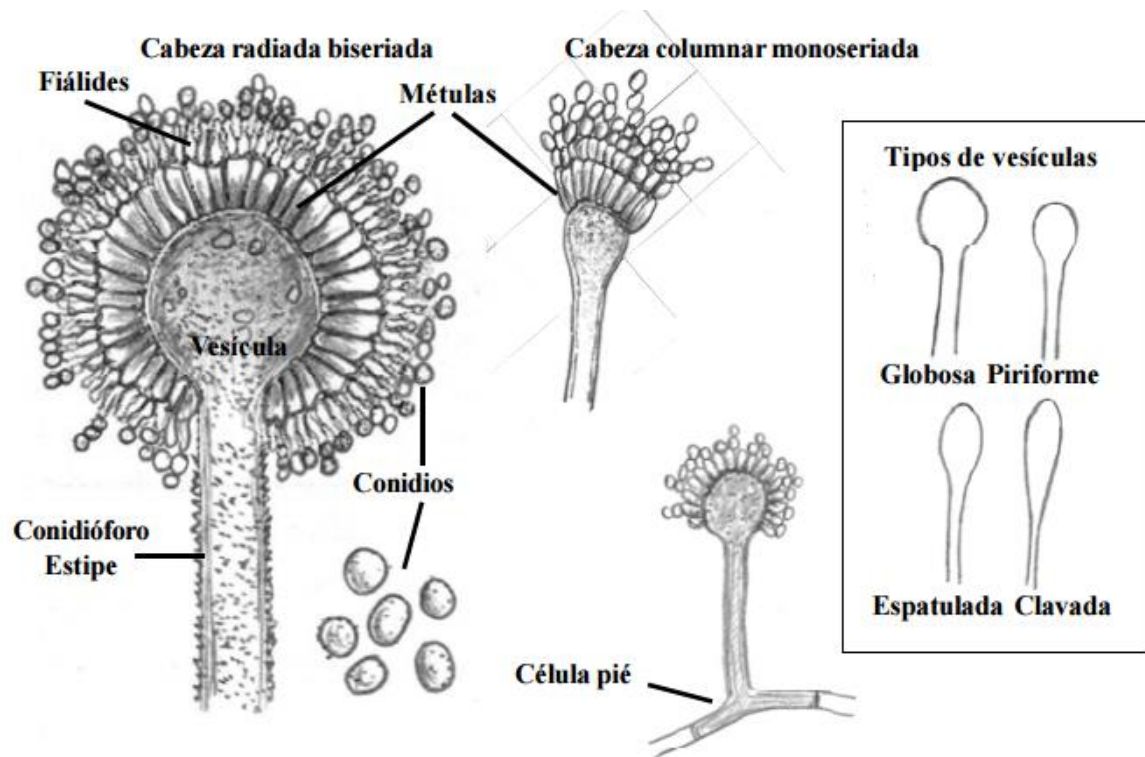
### **I.I-3.2. Taxonomía e identificación del género *Aspergillus***

Según recopilaciones bibliográficas recientes, el género *Aspergillus* se encuentra dividido en 4 subgéneros, cada uno con una o más secciones, y se consideran más de 300 especies (Peterson 2008; Peterson y col. 2008; Varga y col. 2010; Houbraken y Samson 2011; Hubka y col. 2014; Houbraken y col. 2014) (**Tabla 1**).

**Tabla 1:** Clasificación del género *Aspergillus* (Houbraken y col., 2014)

Subgénero	Sección
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Restricti</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i> <i>Cervini</i> <i>Clavati</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i> <i>Bispori</i> <i>Usti</i> <i>Sparci</i> <i>Silvati</i> <i>Ochraceorosei</i> <i>Acni</i> <i>Cremeri</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Terrei</i> <i>Flavi</i> <i>Nigri</i> <i>Circumdati</i> <i>Candidi</i> <i>Flavipedes</i>

*Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, las que habitualmente se denominan fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides, se encuentran otro tipo de células que reciben el nombre de métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan tanto fiálides como métulas toman el nombre de biseriadas (**Figura 2**) (Abarca 2000).



**Figura 2:** Características morfológicas consideradas para la clasificación de las especies del género *Aspergillus* (Abarca 2000).

Para clasificar a las secciones del género *Aspergillus*, se utilizan diferentes medios de cultivo en los cuales se observan las características macro y microscópicas de las colonias:

- Agar extracto de malta (AEM)
- Agar Czapek extracto de levadura (CYA)
- Agar nitrato glicerol al 25% (G25N)
- Agar Czapek extracto de levadura sacarosa al 20% (CY20S)
- Agar creatina sacarosa (CREA)

Todos estos medios son incubados a 28 y/o 37°C durante 7 días, para permitir el desarrollo de las colonias (Samson y col. 2010).

Tras siete días de incubación se procede a la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos:

Principales características macroscópicas:

- Diámetro de las colonias

- Coloración del anverso y del reverso de las colonias
- Presencia de esclerocios
- Presencia de gotas de exudado
- Presencia de pigmento difusible
- Textura de las colonias

Principales características microscópicas:

- Disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula
- Longitud y ancho de los estipes
- Forma y diámetro de las vesículas
- Longitud y ancho de las métulas y fiálides
- Forma, diámetro, ornamentación y color de los conidios
- Forma, tamaño y color de las células de Hülle
- Forma, tamaño y color de las ascosporas (Abarca 2000).

La taxonomía tradicional del género se basa principalmente en sus caracteres fenotípicos y fisiológicos, los cuales han aportado satisfactorias delimitaciones de las especies, sin embargo, existen variaciones morfológicas en varias secciones que han llevado a controversias en sus esquemas taxonómicos. *Aspergillus* y sus teleomorfos han sido investigados con métodos polifásicos (morfológicos, fisiológicos y moleculares) para examinar la variabilidad entre sus especies (Samson y Pitt 2000; Samson y col. 2006; Samson y Varga 2007; Samson y col. 2014). Las especies de *Aspergillus* se estudian mediante sus características macro y micromorfológicas, junto a caracteres de crecimiento en diferentes medios de cultivo, perfiles de extrolitos (micotoxinas) y técnicas moleculares, tales como; secuencias ITS (ITS1-5.8S-ITS2), gen de calmodulina,  $\beta$ -tubulina y segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2) (Geiser 2004; Balajee y col. 2005; Pringle y col. 2005; Varga y col. 2007; Samson y col. 2007; 2014).

### **I.1-3.3. *Aspergillus* sección *Flavi***

Las especies pertenecientes al género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati* y a la sección *Flavi* se encuentran distribuidas mundialmente y son comúnmente aisladas a partir de suelos agrícolas (Saito y col. 1986; Klich 2002; Horn 2003; Nesci y col. 2006). El maní, el maíz y la soja son ecosistemas de cultivos que a menudo son invadidos antes de la cosecha

por estas especies de *Aspergillus* tanto en regiones tropicales como subtropicales (Klich 2002; Horn 2003). Se caracterizan por la ausencia de estructuras de reproducción sexual y por presentar cabezas aspergiliares en tonos verdosos o amarillentos y esclerocios oscuros a la madurez. Las especies más reconocidas son: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*, *A. caelatus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. oryzae* y *A. sojae*, entre otras (Peterson 2000; Samson y col. 2010).

Muchas de las especies son productoras de aflatoxinas (AFs), potentes carcinógenos naturales de preocupación en la inocuidad de los alimentos, y de ácido ciclopiazónico (ACP), que es tóxico para una variedad de animales y ha sido implicado en intoxicación humana (King y col. 2011). Sin embargo, las especies atoxicogénicas han sido propuestas como agentes de control biológico, con el fin de prevenir la contaminación por AFs a través de la exclusión de las cepas toxicogénicas durante la infección (Pitt y Hocking 2006; Dorner 2010; Alaniz Zanon y col. 2013).

## **I.II- Hipótesis**

Las cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* forman parte de la micobiota predominante en suelos destinados al cultivo de soja y maíz. La aplicación prolongada de pesticidas a los suelos agrícolas provoca cambios en la composición y estructura de la micobiota cultivable.

## **I.III- Objetivos**

- Caracterizar la composición de la micobiota cultivable de suelos agrícolas con y sin exposición prolongada a pesticidas.
- Aislar, identificar y caracterizar mediante caracteres fenotípicos y moleculares a las cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* de suelos destinados al cultivo de soja y/o maíz expuestos a la aplicación de los pesticidas clorpirifós y glifosato.
- Evaluar la capacidad de producir aflatoxinas y ácido ciclopiazónico por las cepas aisladas.

## **I.IV- Materiales y métodos**

### **I.IV.1- Metodología**

### **I.IV-1.1. Evaluación de la micobiota cultivable de suelos agrícolas expuestos y no expuestos a pesticidas**

#### **I.IV-1.1.1. Muestreo de suelo**

Las muestras se colectaron en dos campos del sur de la provincia de Córdoba. Uno de ellos posee antecedentes de una exposición prolongada a diferentes pesticidas (más de 10 años) y explotación extensiva de soja y maíz (30°57' de latitud S, 64°50' de longitud O, 562 m de altitud). El otro, en cambio, no presentaba labranza ni antecedentes de exposición prolongada a pesticidas en los últimos 20 años.

El suelo muestreado posee las características típicas de un suelo tipo Hapludol con una textura franco arenoso (Cantero y col. 1999).

El lote muestreado poseía antecedentes de siembra directa con rotación de cultivos entre soja y maíz; y con exposición a pesticidas durante la cosecha 2013-2014. Los muestreos se realizaron durante diferentes períodos detallados a continuación:

**1-2:** post-cosecha soja, junio y septiembre 2013

**3:** siembra maíz, octubre 2013

**4:** Estado V2 de maíz, diciembre 2013

**5:** Estado R2 de maíz, febrero 2014

**6:** Estado R5, abril 2014

**7:** Estado R6, junio 2014

**8:** Post-cosecha maíz, agosto 2014

Se seleccionaron para el muestreo 6 sitios del lote en sección diagonal a intervalos de 100 m cada uno.

Del campo sin labranza ni exposición prolongada a pesticidas se tomaron un total de 30 muestras en distintos sitios de un lote de manera aleatoria.

Durante cada muestreo, cada muestra (de 1 kg) se tomó de la capa superior del suelo (5 cm de profundidad) en cada uno de los sitios elegidos para el muestreo.

En el laboratorio, las muestras se secaron en estufa de aire forzado durante 1-2 días a 25-30°C y se pasó por un tamiz de 2 mm de malla para eliminar restos de vegetales y piedras. Luego fueron homogeneizadas y cuarteadas hasta lograr una sub-muestra representativa de aproximadamente 500 g para su análisis. Se analizó la micobiota dentro de las 48 h del arribo al laboratorio y luego las muestras se conservaron a 4°C.

Además se realizó un análisis de las características físico-químicas de los suelos recolectados: se determinó porcentaje de materia orgánica, contenido de nitrógeno



proveniente de nitratos, nitratos, fósforo, porcentaje de humedad, pH, conductividad eléctrica, contenido de sulfatos, calcio, magnesio, sodio, potasio y capacidad de intercambio catiónico (Walkley y col. 1965; Sparks y col. 1996). Estos análisis fueron llevados a cabo por el laboratorio INTEGRAL AGROPECUARIO, Río Cuarto, Córdoba.

#### **I.IV-1.1.2. Aislamiento, recuento e identificación de la microbiota de suelo**

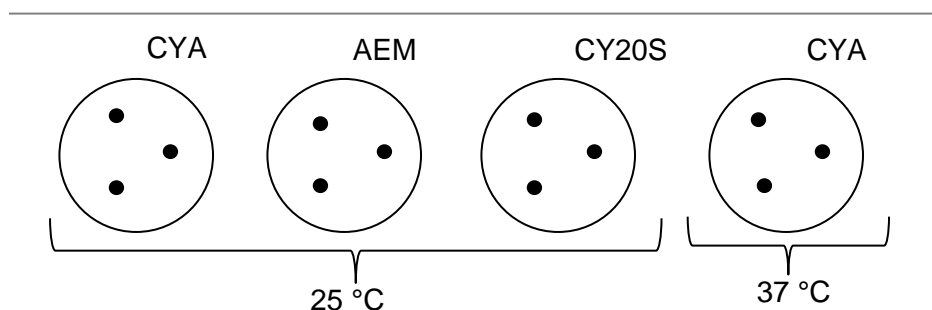
El estudio de la microbiota general se realizó utilizando el método de diseminación en superficie (Pitt y Hocking 2009). Se tomaron 10 g de cada muestra de suelo y se homogeneizaron en agitación (150 rpm) con 90 mL de agua peptonada al 0,1% por 30 minutos. Se realizaron diluciones seriadas factor 10 de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , luego se tomaron alícuotas de 0,1 mL de cada dilución y se sembraron por duplicado sobre el medio diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) modificado con el agregado de 5 mM de glifosato y 0,006 mM de clorpirifós (formulados comerciales). Las muestras de suelo sin exposición a pesticidas se sembraron por duplicado sobre DRBC sin modificar. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 a 7 días. Al final del período de incubación, se seleccionaron las placas que contenían entre 10 y 100 colonias y se realizó el recuento de la microbiota general y de cada género fúngico. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g) y se analizó el porcentaje de muestras en la cual se aislaba cada género fúngico.

#### **I.IV-1.1.3. Identificación morfológica de las especies del género *Aspergillus* sección *Flavi***

Para la identificación de las especies del género *Aspergillus* sección *Flavi* se utilizaron los medios agar extracto de malta (AEM), agar Czapek extracto de levadura (CYA) y agar Czapek extracto de levadura sacarosa (CY20S).

A partir de cada cepa desarrollada en AEM se realizó una suspensión de conidios en agar semisólido y desde allí se inocularon los medios de cultivo en tres puntos equidistantes entre sí, entre el borde y el centro de la placa. Los medios CYA, AEM y CY20S se inocularon e incubaron siguiendo el esquema que se muestra en la **figura 3**.

Finalmente, la identificación se realizó teniendo en cuenta las características macro y microscópicas de cada cepa, siguiendo las claves taxonómicas de Klich (2002) y Samson y col. (2007; 2010).



**Figura 3:** Esquema de inoculación para la identificación de especies del género *Aspergillus* sección *Flavi*.

#### I.IV-1.2. Determinación de la capacidad toxicogénica de las especies de *Aspergillus* sección *Flavi*

##### I.IV-1.2.1. Evaluación de la producción de AFs

La producción de AFs por las cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* se determinó según la metodología propuesta por Geisen (1996). Las cepas aisladas se cultivaron en AEM y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Una colonia de cada cepa fue transferida con ansa a un microtubo y se adicionaron 500  $\mu$ L de cloroformo para la extracción de las toxinas. La mezcla se centrifugó por 20 min a temperatura ambiente a 4.000 rpm. El extracto clorofórmico se separó del micelio y se evaporó a sequedad bajo flujo de  $N_2$ . Para detectar la presencia de AFs en el extracto seco se realizó una cromatografía en capa delgada (TLC). El extracto seco se disolvió en 100  $\mu$ L de cloroformo y se sembró junto a soluciones testigo de AFs (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>) sobre una cromatoplaqueta de sílica gel sin indicador de fluorescencia (G60, Merck). Como solvente de corrida para la misma se utilizó una mezcla de cloroformo: acetona (9:1 v/v) y la cromatografía se desarrolló a temperatura ambiente en cuba saturada hasta que el frente del solvente alcanzó 10 cm a partir de la línea de siembra. La observación de las placas se realizó bajo luz UV a 360 nm.

Para cuantificar la cantidad de AFs producida, se realizó la técnica de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) siguiendo la metodología propuesta por Trucksess y col. (1994). Viales conteniendo 1 mL de medio de cultivo agar extracto de levadura sacarosa (YES) se inocularon con una suspensión de aproximadamente  $10^5$  conidios/mL de cada cepa en estudio y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 7 días. La extracción de AFs se

realizó adicionando 1 mL de cloroformo a cada uno de los viales disgregando el material fúngico con una espátula y agitando vigorosamente durante 1 min. Luego se extrajo la fase clorofórmica y se dejó evaporar a sequedad. El residuo seco se resuspendió en 200  $\mu$ L de metanol y se derivatizó con 700  $\mu$ L de una mezcla de ácido trifluoroacético/ácido acético/agua (20:10:70 v/v/v). Las AFs derivatizadas (50  $\mu$ L) se analizaron usando un equipo HPLC de fase reversa con un sistema de detección de fluorescencia. El sistema de HPLC consistió de una bomba Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA, USA) conectado a un detector de fluorescencia programable Hewlett Packard 1046 y ambos conectados a una estación Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas se desarrollaron en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm d.i., tamaño de partícula 5  $\mu$ m, Luna-Phenomenex, Torrance, CA) conectada a una precolumna SecurityGuard KJO-4282 (20 x 4,6 mm d.i., tamaño de partícula 5  $\mu$ m, Phenomenex). La fase móvil empleada fue acetonitrilo: metanol: agua (1:1:4 v/v/v) a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. La longitud de onda de excitación y emisión fue de 360 y 440 nm, respectivamente. Se construyeron curvas de calibración con las soluciones testigo de diferentes concentraciones de las cuatro AFs. Las mismas se cuantificaron por correlación entre la altura de los picos cromatográficos de las muestras y las curvas estándares. Se determinó la concentración de AFs producida por mililitro de medio de cultivo. El límite de detección del método analítico fue de 1 ng/mL.

#### **I.IV-1.2.2. Evaluación de la producción de ácido ciclopiazónico (ACP)**

Para cuantificar la cantidad de ACP producido, se utilizó la metodología descrita por Lansden y Davidson (1983). Las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* se desarrollaron en el medio de cultivo para producción de micotoxinas. Viales conteniendo 1 mL de medio de cultivo se inocularon con una suspensión de aproximadamente  $10^5$  conidios/mL de cada cepa y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 7 días.

La extracción del ACP se realizó adicionando 1 mL de cloroformo a cada uno de los viales disgregando el material fúngico con una espátula y agitando vigorosamente durante 1 min. Luego se extrajo la fase clorofórmica y se dejó evaporar a sequedad. El ACP se detectó por TLC en cromatoplas de sílica gel con indicador de fluorescencia (G60 F254, Merck). Antes de la siembra, las placas se sumergieron en una solución de ácido oxálico al 2% en etanol y se secaron a 80°C durante 1 hs. Los extractos secos obtenidos de la extracción se disolvieron en 200  $\mu$ L de cloroformo y se sembraron sobre la cromatoplas, previamente activadas, junto a soluciones testigo de ACP. Como solvente de corrida se utilizó una mezcla

de benceno: ácido acético: metanol (90:5:7 v/v/v) y luego se secaron a temperatura ambiente. El ACP se visualizó como una mancha púrpura con un  $R_f$  de 0,45, luego de rociar la placa con p-dimetilaminobenzaldehído al 1%. La detección se realizó comparando el  $R_f$  y la intensidad de las manchas de los extractos y de los testigos. El límite de detección del método analítico fue de 1  $\mu\text{g/mL}$ .

A fin de seleccionar aquellas cepas no toxicogénicas para futuros ensayos de tolerancia y remoción de pesticidas, se realizó una metodología alternativa descrita por Shotwell y col. (1966) con la cual se confirma la producción de ACP. Las cepas se desarrollaron en 25 g de arroz contenidos en frascos Erlenmeyers de 250 mL previamente hidratados y esterilizados en autoclave a 120°C, 15 min. La incubación se realizó a 25°C por 7 días. Luego del período de incubación, se inactivaron los cultivos fúngicos en autoclave a 120°C, 15 min., se secaron en estufa de aire forzado a 60°C y se molieron. La extracción del ACP se realizó adicionando 50 mL de cloroformo a los frascos Erlenmeyers que contenían los cultivos molidos. Se agitaron por 30 minutos y se filtraron con papel Whatman N°2. El filtrado se recolectó y se evaporó en rotaevaporador a 60°C. El ACP fue detectado por TLC en cromatoplasas de sílica gel sin indicador de fluorescencia (G60, Merck) siguiendo la misma metodología que se detalló anteriormente.

### **I.IV-1.3. Identificación molecular de las especies no toxicogénicas del género *Aspergillus* sección *Flavi* utilizadas en los ensayos *in vitro***

#### **I.IV-1.3.1. Producción de biomasa fúngica y extracción de ADN**

De cada cepa identificada morfológicamente como *Aspergillus flavus* y que resultó no toxicogénica, se transfirió una ansada de conidios de un cultivo de 7 días en AEM a frascos Erlenmeyers de 250 mL que contenían 50 mL del medio de cultivo Wikerman (Mulè y col. 2006). Los frascos se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm a 25°C por 3 días. Luego de la incubación, se recolectó el micelio por filtración bajo vacío, se lavó con agua estéril y se realizó el secado del mismo con papel absorbente para luego almacenar el micelio de cada cepa a -20°C. Posteriormente, se pulverizó el micelio congelado con nitrógeno líquido en morteros y se distribuyeron entre 1,5 - 2 g del mismo en microtubos, que fueron nuevamente almacenados a una temperatura de -20°C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

El ADN se extrajo con buffer CTAB siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006) y descrita a continuación. A cada tubo con micelio se le agregaron 700

μL de buffer CTAB al 2% pre-calentado a 65°C, y 15 μL de 2-mercaptoetanol. Los tubos se agitaron en vórtex durante 2 min y se incubaron a 65°C durante 30 min. Luego se agregaron 500 μL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó la mezcla nuevamente en vórtex durante 1 min y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se transfirieron 600 μL de la fase acuosa a tubos limpios y estériles a los que se les adicionaron 600 μL de isopropanol. Los tubos se invirtieron varias veces y la mezcla se dejó a 4°C toda la noche para permitir la precipitación total de ADN. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se los invirtió abiertos sobre papel absorbente limpio aproximadamente durante 4-5 min para eliminar los restos de isopropanol. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 100 μL de buffer TE 1X y se conservaron a -20°C.

#### **I.IV-1.3.2. Cuantificación de ADN total**

Para cuantificar el ADN total extraído, las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio (0,5 μg/mL). Luego de la corrida electroforética, la concentración y la pureza del ADN se determinó por espectrofotometría bajo luz UV. La estimación de la concentración del ADN se realizó por comparación visual con la intensidad de las bandas del marcador lambda de ADN (λ) (Promega®, Madison, WI, USA).

#### **I.IV-1.3.3. Reacción de PCR**

Se seleccionaron 4 muestras de ADN previamente cuantificado correspondientes a 4 cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* no toxicogénicas para realizar la amplificación del gen de calmodulina y β-tubulina a fin de confirmar la identificación morfológica realizada anteriormente. Se utilizaron los cebadores y los reactivos descritos por Hong y col. (2006) para el gen calmodulina, mientras que para el gen β-tubulina se realizó la metodología descrita por Glass y Donaldson (1995). La secuencia de los cebadores utilizados se muestra en la **tabla 2**.

**Tabla 2:** Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los genes calmodulina y  $\beta$ -tubulina.

CL1	GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC
CL2A	TTTTGCATCATGAGTTGGAC
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC

La reacción de PCR se realizó en una mezcla de 50  $\mu$ L que contenía 0,2 mM de cada dNTPs; 1X Buffer PCR: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM  $Mg_2Cl$  (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI); 0,3  $\mu$ M de cada cebador; 20 ng de ADN genómico y 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI). Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos. La amplificación se realizó en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C por 5 min., seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C (calmodulina) o 55°C ( $\beta$ -tubulina) por 50 seg, 72°C por 60 seg. Se realizó una extensión final de 7 min. a 72°C después de los 35 ciclos. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% tiñendo con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/mL) y se visualizaron con un analizador de imágenes miniBis (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., HaHamisha Ma, Jerusalem, Israel). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (New England Biolabs, Inc., 100-pb Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 – 1.500 pb.

#### I.IV-1.3.4. Purificación y secuenciación de ADN

Los fragmentos amplificados a partir de la secuencia analizada se purificaron utilizando columnas de purificación de ADN (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Ambas cadenas de ADN se secuenciaron con cada par de cebadores utilizados usando un secuenciador Applied Biosystem ABI 3730 sequencer (Applied Biosystem). Las secuencias de ambas cadenas de ADN de los productos de PCR se alinearon usando la aplicación *ClustalW* (Thompson y col. 1994) del programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall 1999) y en el caso que resultara necesario, se ajustaron manualmente. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el GeneBank (NCBI o

National Center for Biotechnology Information) para determinar su homología con otras especies.

### **I.IV.1.3- Análisis estadístico de los datos**

Los análisis de los datos se realizaron mediante el análisis de varianza. Los recuentos de hongos y los datos porcentuales se transformaron usando una función logarítmica  $\log_{10}(x + 1)$  antes de aplicar el análisis de la varianza. La prueba de Fisher (LSD) fue utilizada para determinar las diferencias significativas entre las medias de los recuentos de hongos o el porcentaje de muestras contaminadas por los diferentes géneros y especies analizadas. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat, 2010p de la Universidad Nacional de Córdoba.

### **I.IV.2- Materiales**

#### **I.IV.2.1. Medios de Cultivo**

-Agar diclorán-rosa de bengala-cloranfenicol (DRBC): peptona 5 g, glucosa 10 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g, diclorán 0,002 g, rosa de bengala 0,0025 g, agar-agar 15 g, agua destilada cnp. 1000 mL.

-Agar extracto de malta (AEM): extracto de malta 20 g, peptona 5 g, glucosa 20 g, agar-agar 15 g, agua destilada cnp. 1000 mL.

-Agar Czapek extracto de levadura (CYA):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g, Czapek concentrado\* 10 mL, extracto de levadura 5 g, sacarosa 30 g, agar-agar 15 g, agua destilada cnp. 1000 mL.

\*Czapek concentrado:  $\text{NaNO}_3$  30 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,05 g, agua destilada cnp. 1000 mL.

-Agar semisólido: agar al 0,2 g, Tween 80, agua destilada cnp. 1000 mL.

-Agar Czapek extracto de levadura con 20% de sacarosa (CY20S):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g, Czapek concentrado 10 mL, extracto de levadura 5 g, sacarosa 200 g, agar-agar 15 g, agua destilada cnp. 1000 mL.

-Medio de producción de micotoxinas: sacarosa 150 g, glucosa 40 g, extracto de levadura 20 g, peptona de soja 10 g, agua destilada 1000 mL. pH ajustado a 5,9 con ácido clorhídrico 0,1N.

-Agar extracto de levadura sacarosa (YES): extracto de levadura 20 g, sacarosa 150 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,005 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g, agar-agar 20 g, agua destilada 1000 mL.

-Medio Wikerman: glucosa 40 g, peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, extracto de malta 3 g, agua destilada cnp 1000 mL.

#### **I.IV-2.2. Soluciones**

-Solución stock de rosa de bengala: 25 mg de rosa de bengala disueltos con 30 ml de etanol al 95% y se llevó a 100 mL con agua destilada.

-Solución stock de cloranfenicol: 250 mg de cloranfenicol disueltos en 100 mL de etanol al 95%.

-Solución stock de diclorán: 200 mg de diclorán se llevaron a 100 mL con etanol.

-Solución de glifosato: se preparó una solución madre de concentración 2 M. Se tomaron 14,4 mL de glifosato comercial (Roundup 1®, 3,5 mol/L de ingrediente activo) y se enrasaron con agua destilada en 25 mL. Cuando se utilizó Roundup Ultramax® (cantidad de principio activo: 680 g/Kg) se preparó una solución madre de concentración 2 M. Se pesaron 2,26 g y se disolvieron en 50 mL de agua destilada.

-Solución de clorpirifós: se preparó una solución madre de concentración 1 g/L. Se tomaron 0,95 mL de clorpirifós comercial (Hortal®) y se enrasaron con agua destilada en 100 mL. Cantidad principio activo: 10,5 g/100 mL.

-Solución de ácido oxálico: se pesaron 2 g de ácido oxálico y se disolvieron en 100 mL de etanol.

-Solución de benceno:ácido acético:metanol: se mezclaron 90 mL de benceno, 5 mL de ácido acético y 7 mL de metanol.

-Solución de p-dimetilaminobenzaldehído: se pesó 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disolvió en 75 mL de etanol y se le adicionaron 25 mL de ácido clorhídrico.

-Soluciones testigo de micotoxinas: se prepararon tres soluciones en metanol conteniendo las cuatro AFs ( $\text{AFB}_1$ ,  $\text{AFB}_2$ ,  $\text{AFG}_1$  y  $\text{AFG}_2$ - Sigma Aldrich) de concentración 1 y 3  $\mu\text{g/L}$  para



la técnica de TLC y de 3, 5 y 10 ng/mL para la técnica de HPLC. Se prepararon dos soluciones de ACP (Sigma Aldrich) de concentración 0,5 y 1 µg/mL.

-Solución Tris-HCl: se pesó 121,1 g de Tris base y se disolvió en 800 mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 8,3 con HCl concentrado.

-Buffer TE: se mezclaron 1 mL de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8,3 y 0,2 mL de EDTA 1 mM pH 8.

-Buffer CTAB: se pesó 10 g de CTAB y se disolvió en 350 mL de agua bidestilada. Luego se adicionó 50 mL de Tris-HCl 1 M y 20 mL de EDTA 0,5 M. Por último se agregó 40,9 g de NaCl y se completó a un volumen de 500 mL con agua bidestilada.

## I.V- Resultados y discusión

### I.V.1- Evaluación de la microbiota cultivable de suelos agrícolas expuestos y no expuestos a pesticidas

#### I.V.1.1- Análisis físico químico de suelo

Las principales características físico-químicas del suelo analizado (con y sin exposición a pesticidas) se muestran en la **tabla 3**. En general el suelo sin exposición a pesticidas mostró valores más elevados de materia orgánica, nitrógeno, nitratos y fósforo con respecto al suelo expuesto a pesticidas.

**Tabla 3:** Características físico-químicas de los suelos analizados

	Suelo con exposición*	Suelo sin exposición*
<b>Materia orgánica (%)</b>	2,95	5,13
<b>Nitrógeno de Nitratos (ppm)</b>	23	82,00
<b>Nitratos (ppm)</b>	101,9	363,30
<b>Fósforo (ppm)</b>	56,20	75,00
<b>Humedad (%)</b>	5	7,80
<b>pH</b>	7,57	6,78

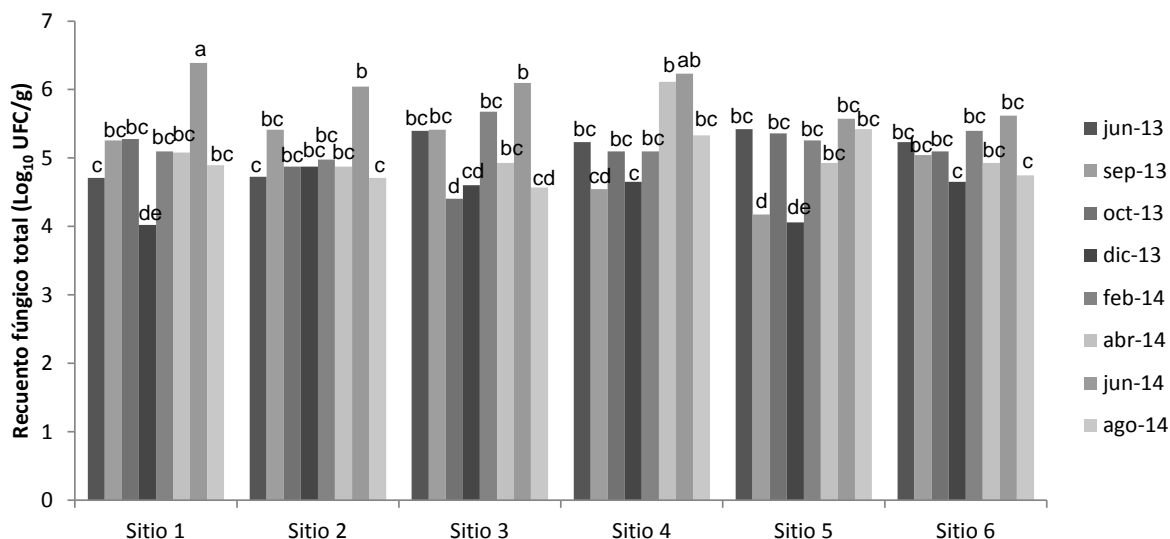
<b>Conductividad eléctrica (dS/m)</b>	0,50	0,90
<b>Sulfatos (ppm)</b>	3,80	3,60
<b>Calcio (cmol/Kg)</b>	15,25	16,50
<b>Magnesio (cmol/Kg)</b>	4,25	0,70
<b>Sodio (cmol/Kg)</b>	0,52	0,34
<b>Potasio (cmol/Kg)</b>	2,10	2,80
<b>CIC (cmol/kg)**</b>	22,70	21,40

\*Exposición a pesticidas (más de 10 años)

\*\*Capacidad de intercambio de cationes

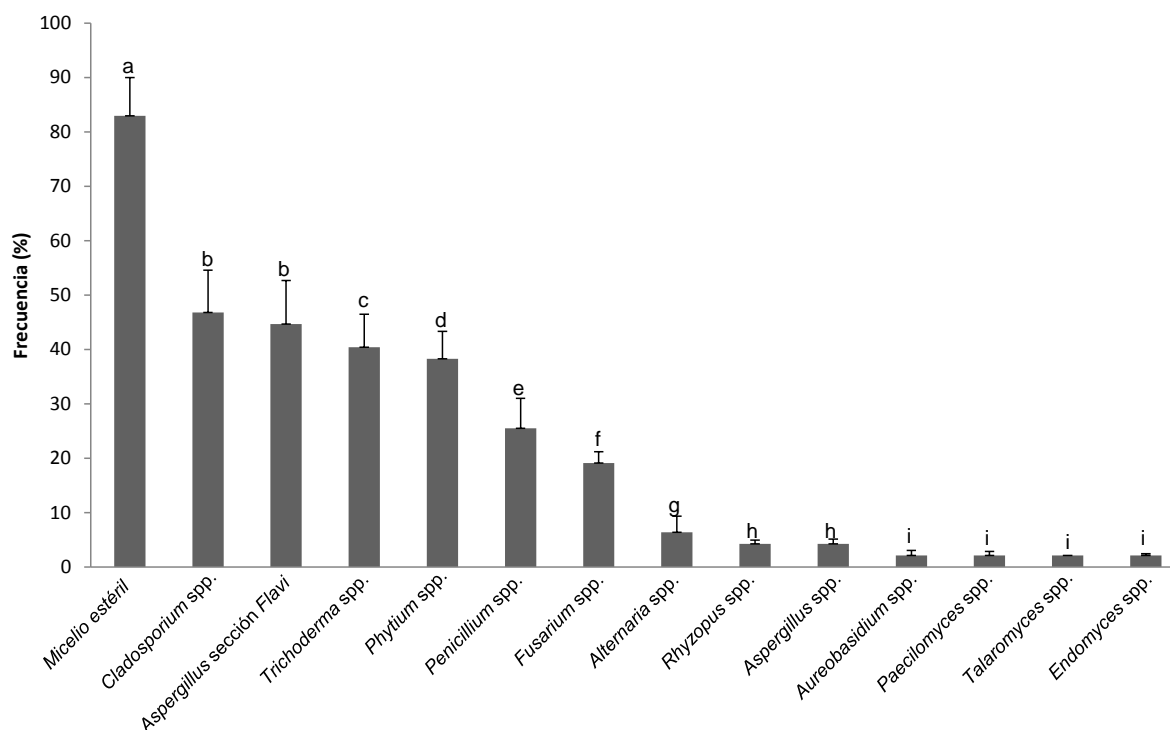
#### I.V.1.2- Evaluación de la micobiota cultivable

La **figura 4** muestra los valores medios de los recuentos fúngicos totales ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de los distintos sitios de muestreo de un suelo agrícola expuesto a pesticidas evaluados a lo largo del año. En general, considerando cada sitio, los valores de recuento fúngico total no variaron significativamente en los distintos períodos de muestreo ( $p < 0,01$ ). Los recuentos oscilaron entre 4 y 6,4  $\text{Log}_{10}$  UFC/g. Los valores más altos se registraron en todos los sitios en las muestras de junio de 2014.



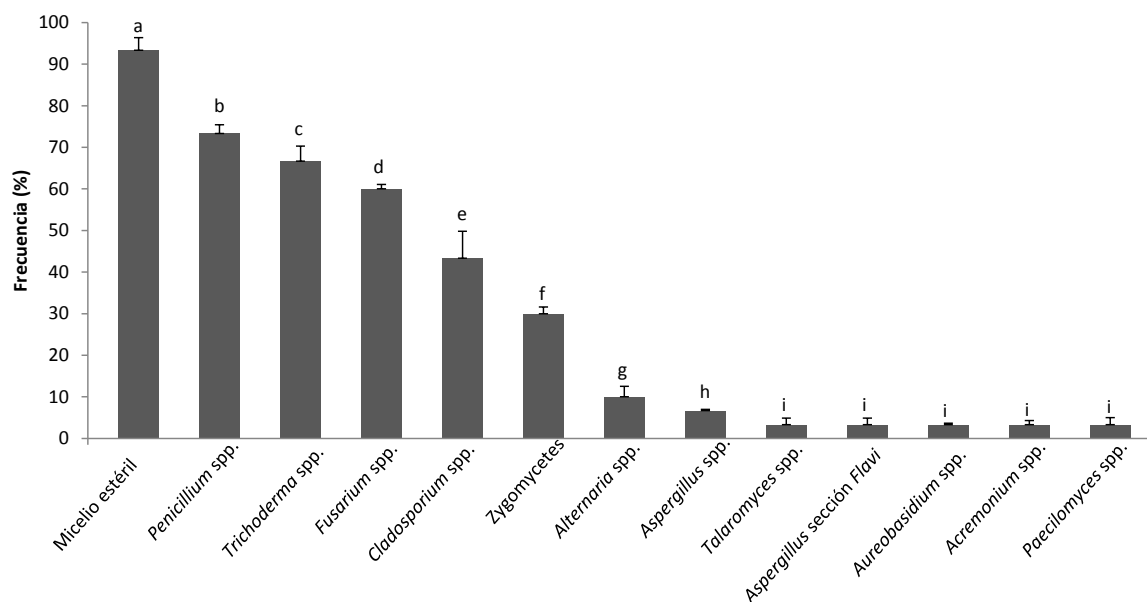
**Figura 4:** Logaritmo del recuento fúngico total de los diferentes sitios de muestreo de un suelo agrícola expuesto a pesticidas en 8 períodos de muestreo. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) de acuerdo al test LSD.

Respecto al análisis de la micobiota general cultivable, se aislaron un total de 13 géneros de hongos filamentosos. La evaluación de la totalidad de las muestras mostró que los géneros más frecuentes fueron *Micelio estéril*, *Trichoderma* spp., *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Flavi* y *Cladosporium* spp. aislados en 88, 47, 44 y 39% de las muestras, respectivamente. Seguidos por los géneros *Phytium* spp., *Penicillium* spp y *Fusarium* spp. los cuales se aislaron en una frecuencia moderada, mientras que *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Aureobasidium* spp., *Paecilomyces* spp., *Talaromyces* spp. y *Endomyces* spp. lo hicieron en muy baja frecuencia ( $p < 0,0001$ ). En la **figura 5** se muestran los distintos géneros fúngicos aislados en todas las muestras analizadas.

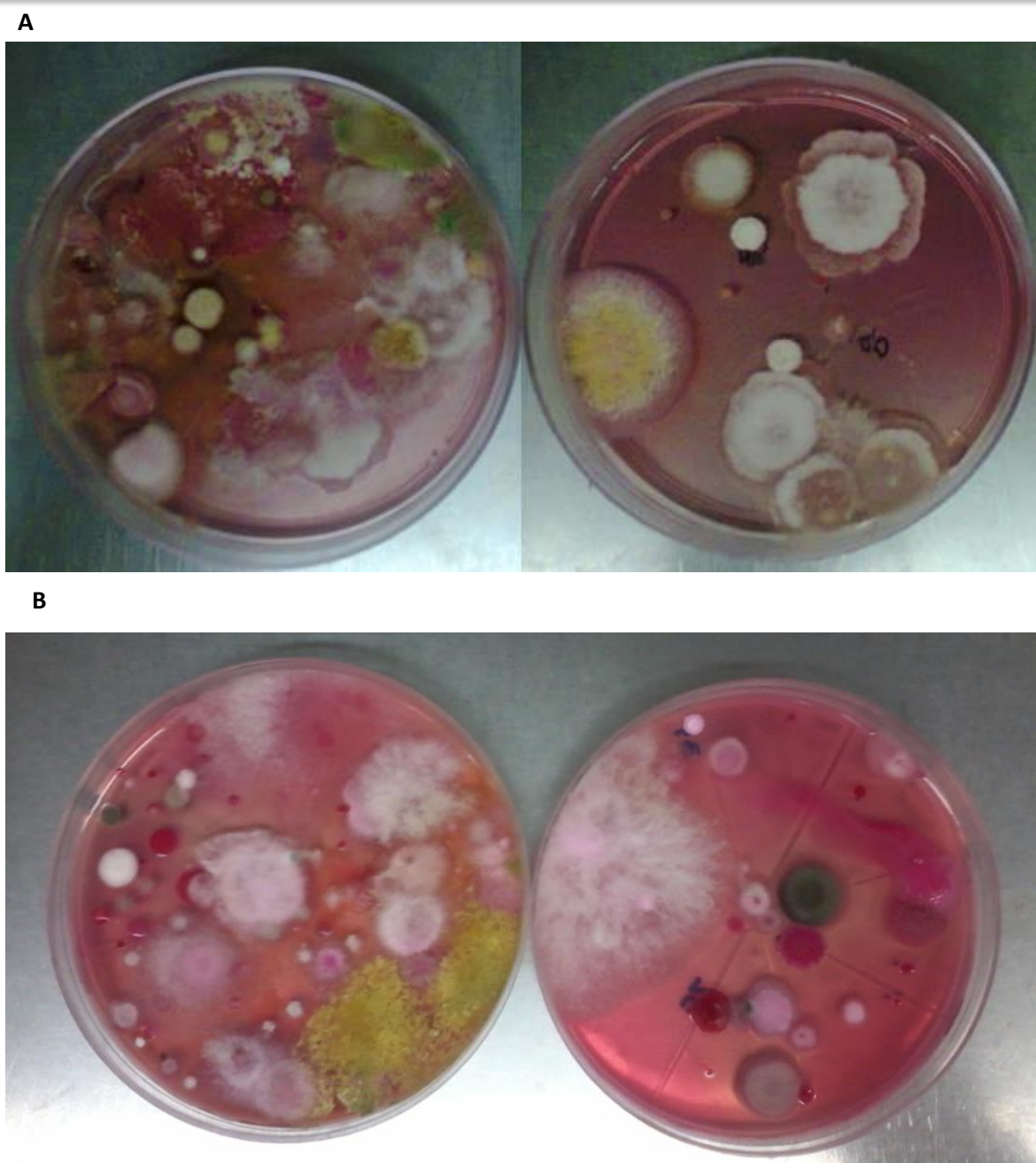


**Figura 5:** Distribución de los géneros fúngicos aislados en las muestras de un suelo agrícola expuesto a pesticidas. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD.

En la **figura 6** se muestra la micobiota cultivable aislada de suelo agrícola sin exposición prolongada a pesticidas (por más de 20 años). Los géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia en todas las muestras analizadas fueron *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. y el grupo de hongos denominados como Micelio estéril. Todos fueron aislados en una frecuencia mayor al 60%. *Cladosporium* spp., Zygomycetes y *Alternaria* spp. se aislaron en una frecuencia moderada; mientras que *Aspergillus* spp., *Talaromyces* spp., *Aspergillus* sección *Flavi*, *Aureobasidium* spp., *Acremonium* spp. y *Paecilomyces* spp se aislaron en muy baja frecuencia ( $p < 0,0001$ ). Los recuentos fúngicos totales oscilaron entre 4,4 y 5,7 Log<sub>10</sub> UFC/g. En la **figura 7** se muestran placas representativas de la micobiota cultivable en el medio DRBC.



**Figura 6:** Distribución de los géneros fúngicos aislados en las muestras de un suelo agrícola sin exposición prolongada a pesticidas. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ )



**Figura 7:** Distribución de la microbiota cultivable en el medio DRBC a los 7 días de incubación, en muestras de suelo expuestos a glifosato en el período diciembre de 2013, dilución  $10^{-2}$  y dilución  $10^{-3}$  (A) y en muestras de suelo sin exposición a pesticidas dilución  $10^{-2}$  y dilución  $10^{-3}$  (B).

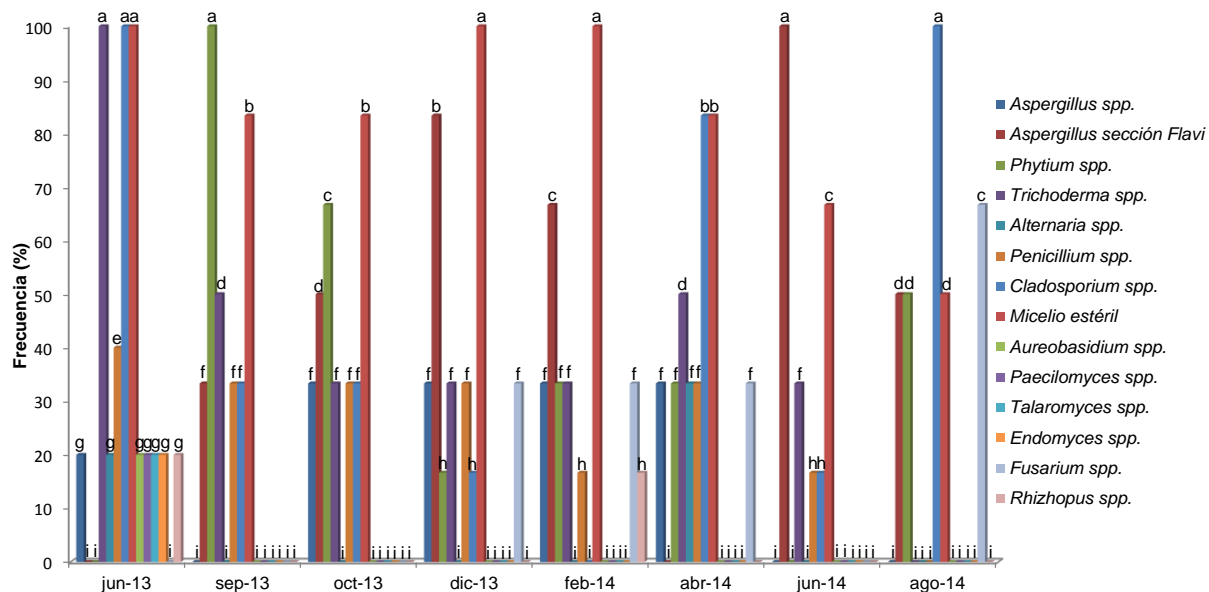
En cuanto a los géneros fúngicos aislados en el suelo agrícola sin labranza ni exposición a pesticidas se observó que sólo algunos de ellos coincidieron con los aislados en el muestreo de suelo agrícola expuesto a pesticidas. *Trichoderma* spp. y el grupo Micelio estéril fueron algunos de los géneros aislados con mayor frecuencia en ambos tipos de suelos, seguidos por *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp, *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. Es

importante destacar que las especies de *Aspergillus* sección *Flavi* sólo se aislaron en los suelos expuestos a pesticidas y *Acremonium* spp. de los suelos sin exposición. Estos resultados son similares a los informados por Wuczkowski y col. (2003), los cuales observaron algunas diferencias en cuanto a los géneros fúngicos aislados de suelos agrícolas con manejo convencional con respecto a suelos con manejo ecológico recolectados de una región cercana a la ciudad de Vienna, Austria. El género *Fusarium* spp. sólo se aisló de los suelos agrícolas, mientras que *Cylindrocarpon* spp. y *Trichoderma* spp. se aislaron en menor frecuencia en estos suelos. Mientras que los géneros *Nectria* spp., *Periconia* spp. y *Tricellula* spp. se aislaron únicamente en los suelos agrícolas con manejo ecológico. En otro trabajo realizado por Cabello y Arambarri (2002) se evaluó, en suelos de la provincia de Buenos Aires, la micobiota cultivable de suelos de bosques sin intervención del hombre y con intervención. Estos autores observaron que los recuentos fúngicos en el suelo sin intervención (5,6-5,7 Log<sub>10</sub> UFC/g) fueron significativamente mayores que los detectados en los suelos con intervención del hombre (5,3 Log<sub>10</sub> UFC/g). Estos resultados no concuerdan con lo observado en este trabajo al comparar los recuentos fúngicos totales de los suelos expuestos a pesticidas y los suelos sin exposición, ya que los valores oscilaron entre 4 a 6,4 y 4,4 a 5,7 Log<sub>10</sub> UFC/g respectivamente; es decir, que se registraron mayores recuentos en el suelo con exposición a pesticidas. En concordancia con los resultados de este trabajo, estos autores también aislaron varias especies fúngicas en ambos tipos de suelo (*Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Doratomyces* spp., *Gliocladium* spp., *Fusarium* spp., *Metarhizium* spp., *Penicillium* spp.), mientras que sólo algunos géneros se aislaron exclusivamente en uno de los dos tipos de suelos analizados (*Beauveria* spp., *Volutella* spp. y *Wardomyces* spp.). En el presente trabajo los géneros Micelio estéril, *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp se aislaron de ambos tipos de suelos, lo cual indicaría una adaptación de los mismos al uso de pesticidas.

Estos resultados sugieren que la presencia de pesticidas supone una presión selectiva que afecta la actividad microbiana del suelo, favoreciendo el desarrollo de algunas especies fúngicas más adaptadas al ecosistema en detrimento de otras con la posibilidad de estar implicadas en la degradación de éstos compuestos (Araujo y col. 2003; Girvan y col. 2004).

En la **figura 8** se muestra nuevamente la frecuencia de aislamiento de los distintos géneros fúngicos aislados de suelo con exposición a pesticidas pero considerando cada período de muestreo. En general, aquellos géneros aislados con mayor frecuencia se mantenían en porcentajes similares en todos los períodos analizados. Los géneros que se

presentaron en todos los períodos fueron *Aspergillus* sección *Flavi*, *Phytium* spp., *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp. y el grupo Micelio estéril ( $p<0,0001$ ).



**Figura 8:** Distribución de los géneros fúngicos aislados en las muestras de un suelo agrícola expuesto a pesticidas de acuerdo a los períodos muestreados. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p<0,0001$ ) de acuerdo al test LSD.

Estos ensayos permitieron determinar la presencia de diferentes especies fúngicas cultivables en suelos agrícolas de nuestra región destinados al cultivo de maíz expuestos reiteradamente al agregado de pesticidas. Se aislaron un total de 13 géneros de hongos filamentosos, siendo *Trichoderma* spp., *Aspergillus* sección *Flavi*, *Cladosporium* spp. y el grupo Micelio estéril aislados en mayor frecuencia, seguidos principalmente por *Phytium* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Aureobasidium* spp., *Paecilomyces* spp., *Talaromyces* spp. y *Endomyces* spp. Es importante destacar que las especies pertenecientes a *Aspergillus* spp. se aislaron de los períodos de junio, octubre, diciembre de 2013 y los períodos de febrero y abril de 2014. Además, las especies de *Aspergillus* sección *Flavi* se aislaron de todos los períodos muestreados con excepción del período de junio 2013. Estos resultados coinciden parcialmente con los descritos en el muestreo anterior realizado en los campos de la misma zona donde los géneros mayormente aislados fueron *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp y *Paecilomyces* spp. (Carranza y col. 2014a). En un trabajo realizado por Nesci y col. (2006) se aislaron como micobiota predominante en suelos de la misma zona con cultivo de maíz y



labranza convencional algunos géneros informados en este trabajo, tales como *Aspergillus* spp. (20-40% de las muestras), *Penicillium* spp. (80%), *Trichoderma* spp. (90%), *Fusarium* spp. (40%) y *Cladosporium* spp. (40-80%). Es importante destacar que en general tanto en el presente trabajo como en otros estudios realizados en suelos agrícolas de nuestra región, las especies de *Aspergillus* y dentro de ellas las pertenecientes a la sección *Flavi* se aíslan en alta frecuencia (Nesci y Etcheverry 2002; Barros y col. 2005; Nesci y col. 2006; Carranza y col. 2014a).

## **I.V.2- Determinación de la capacidad toxicogénica de las especies de *Aspergillus* sección *Flavi***

### **I.V.2.1- Evaluación de la producción de AFB<sub>1</sub> y ACP**

Se aislaron un total de 42 cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* de suelos agrícolas expuestos a pesticidas, de las cuales 34 se identificaron morfológicamente como *A. flavus* y el resto como *A. parasiticus*. En la **tabla 4** se muestran los resultados del análisis de la capacidad toxicogénica de las cepas aisladas. De la totalidad de las cepas, el 98% resultó productor de AFB<sub>1</sub> y/o ACP siendo el 31% productor de ambas micotoxinas (quimiotipo I), mientras que, el 45% fue productor solo de AFB<sub>1</sub> (III) y sólo el 2,4% produjo ACP (IV). La totalidad de las cepas de *A. parasiticus* aisladas fueron productoras de AFB<sub>1</sub> y no de ACP.

**Tabla 4:** Producción de AFB<sub>1</sub> y ACP por cepas de *A. sección Flavi* aisladas de suelo agrícola expuesto a pesticidas.

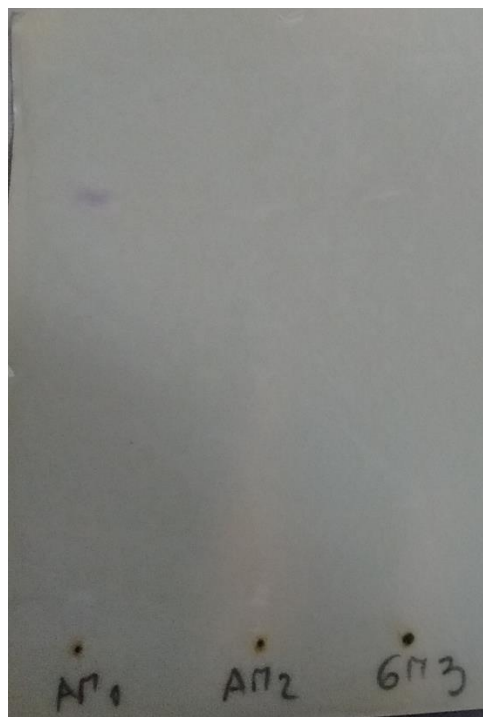
Especies	Cepas positivas	Período de muestreo	ACP*	Rango AFB <sub>1</sub> (ng/mL)	Media AFB <sub>1</sub> (ng/mL)±DE	Quimiotipo
<i>A. flavus</i>	5	Sept-2013	ND	1,40-2,40	1,76 ± 0,36	III
<i>A. flavus</i>	1	Oct-2013	ND	139,8-143,0	141,40 ± 1,60	III
	2		ND	1,50-2,90	2,20 ± 0,70	III
<i>A. flavus</i>	7	Dic-2013	ND	1,30-8,40	5,83 ± 3,10	III
	2		ND	11,30-51,70	31,5 ± 20,20	III
	7		+	6,25-22,69	11,33 ± 6,50	I
<i>A. flavus</i>	1	Feb-2014	ND	3,39-4,90	4,10 ± 0,62	III
	1		ND	129,30-125,80	127,55 ± 1,75	III
<i>A. parasiticus</i>	1	Abr-2014	ND	89,3-179,1	95,60 ± 5,31	
	1		ND	-	ND	V
<i>A. flavus</i>	4	Jun-2014	+	6,94-16,31	12,73 ± 3,49	I
	1		+	150,90-201,33	178,72 ± 20,91	I
<i>A. parasiticus</i>	5		ND	91,04-283,03	157,33 ± 68,81	
<i>A. flavus</i>	1	Ago-2014	+	98,5-179,1	129,30 ± 35,54	I
	1		+	-	ND	IV
<i>A. parasiticus</i>	1		ND	5,9-15,5	10,70 ± 3,91	
	1		ND	203,2-226,5	216,90 ± 9,93	

ND: no detectado

### I.V.3- Selección de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* no toxicogénicas para futuros ensayos de tolerancia y remoción de glifosato y clorpirifós

Para los ensayos de tolerancia y remoción de glifosato y clorpirifós de los próximos capítulos de este trabajo se seleccionaron aquellas cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* no productoras de AFs ni ACP mediante la metodología propuesta por Lansden y Davidson (1983). Debido a que en el muestreo de suelo agrícola realizado no se aislaron un número considerable de cepas del quimiotipo V (no productoras de AFs ni ACP), se utilizaron 4 cepas quimiotipo V aisladas en un muestreo previo de la misma zona agrícola (Carranza y col. 2014a). Con el objetivo de confirmar la capacidad de producir ACP por las cepas seleccionadas, se realizó esta experiencia que consistió en incubarlas en un medio a base de arroz y a una temperatura de 25°C (Shotwell y col. 1966).

La cepa de *A. flavus* GM4 y las cepas de *A. oryzae* AM2 y GM3 resultaron no productoras de ACP. Mientras que la cepa de *A. oryzae* AM1 resultó positiva para la producción de ACP (Figura 9).



**Figura 9:** Cromatoplaqueta mostrando la coloración violeta del ACP luego de rociar la placa con p-dimetilaminobenzaldehído confirmando la producción de la toxina.

En el estudio realizado por Nesci y col. (2006) también informaron un porcentaje alto de aislamiento de la especie *A. flavus* en comparación con *A. parasiticus*. En otros estudios realizados en suelos destinados al cultivo de maní en nuestra región, se aislaron tanto *A.*

*flavus* como *A. parasiticus*, pero los porcentajes de *A. flavus* fueron siempre más elevados (Barros y col. 2003; 2005). En muestras de maní, soja y trigo, Vaamonde y col. (2003) informaron como especie predominante *A. flavus* en todos los sustratos analizados, mientras que en maní se aislaron en igual proporción las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*.

En cuanto a *A. flavus*, es considerada la especie de la sección *Flavi* de mayor distribución mundial y se aísla principalmente en suelos de cultivo de maní, entre otros sustratos. Por otra parte, y como es común entre diferentes cepas de hongos toxigénicos, las cepas de *A. flavus* difieren en cuanto a la producción de micotoxinas, variando desde no productoras a productoras de niveles elevados de alguna, varias o todas las toxinas registradas para la especie (Pildain y col. 2005).

En Argentina se han llevado a cabo varios estudios sobre *A. flavus* provenientes de suelos y semillas de maní, maíz y otros cultivos (Vaamonde y col. 1995; Resnik y col. 1996; Novas y Cabral 2002; Nesci y Etcheverry 2002; Barros y col. 2003; Pildain y col. 2004; Camiletti y col. 2017). A partir de éstos se establecieron cinco quimiotipos diferentes basados en la capacidad de producir AFs de tipo B, G y ACP y, además, se determinó la proporción de cada uno de ellos en diversos sustratos (maní, soja, maíz y trigo), con una considerable variabilidad en la capacidad de producir AFs por las cepas aisladas (Cotty y Cardwell 1999; Horn y Dorner 1999; Vaamonde y col. 2003; Barros y col. 2003; 2005).

En el presente trabajo, el 45% de las cepas aisladas produjeron sólo AFB<sub>1</sub> por lo tanto pertenecen al quimiotipo III. Estos resultados difieren de los informados en el muestreo anterior donde sólo el 17,5% de las cepas toxicogénicas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* aisladas pertenecieron al quimiotipo III (Carranza y col. 2014a) y también difieren de los informados por otros autores, en los cuales se aisló una proporción alta de cepas de *A. flavus* productoras de AFB<sub>1</sub> y ACP. Barros y col. (2005) observaron que un 80% de las cepas de *A. flavus* aisladas de suelos de cultivo de maní eran productoras de ambas micotoxinas; éstos resultados son similares a los informados en el mismo sustrato por Horn y Dorner (1999); mientras que Vaamonde y col. (2003), detectaron un 50% de cepas pertenecientes a este quimiotipo I y un 13% al quimiotipo II. En otro trabajo, Nesci y Etcheverry (2002) encontraron porcentajes inferiores de cepas productoras de AFs (12 a 18%) en suelos de cultivo de maíz en la zona sur de la provincia de Córdoba. En un trabajo más reciente, Camiletti y col. (2017) informaron un 79% de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* pertenecientes al quimiotipo I aisladas de maíz también en la provincia de Córdoba.

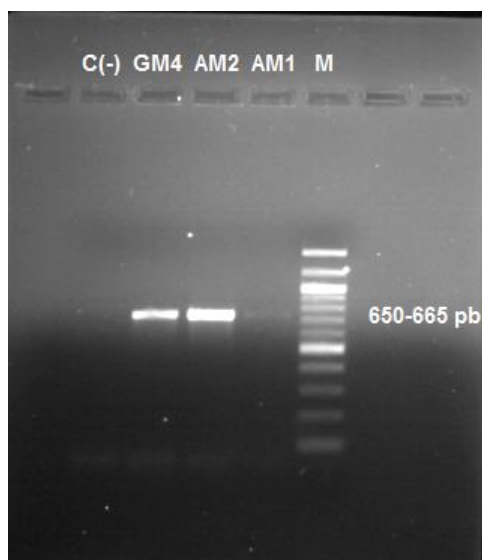
Con respecto a las cepas productoras de una de las dos toxinas (es decir AFB<sub>1</sub> o ACP) Horn y Dorner (1999) obtuvieron un porcentaje de 0,6 y 12,4% de cepas productoras de

AFB<sub>1</sub> y ACP, respectivamente. Mientras que en este trabajo se observó un porcentaje más elevado de cepas productoras sólo de AFB<sub>1</sub> (45%) y la frecuencia de cepas productoras sólo de ACP fue del 2,4%. En el estudio realizado por Vaamonde y col. (2003), un 2,2% de las cepas de *A. flavus* aisladas de todos los sustratos fueron productoras sólo de AFB<sub>1</sub> lo cual coincide con lo observado por Horn y Dorner (1999) pero no con lo registrado en este trabajo. Con respecto a las cepas del quimiotipo IV (es decir ACP +), estos autores obtuvieron una alta proporción de cepas productoras de ACP en soja (68%), trigo (80%) y maní (27%) siendo opuesto a lo evidenciado por este estudio.

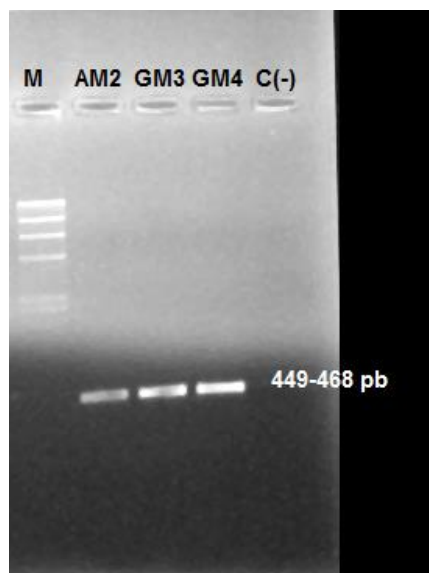
#### I.V.4- Identificación molecular de las especies no toxicogénicas del género *Aspergillus* sección *Flavi* utilizadas en los ensayos *in vitro*

Al amplificar la secuencia del gen de calmodulina y  $\beta$ -tubulina utilizando PCR de las cuatro cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* seleccionadas para los ensayos *in vitro*, se observó que el tamaño de la secuencia amplificada varió entre 650 a 665 y 449 y 468 pb, respectivamente (**Figura 10**).

A



B



**Figura 10:** Amplificación de los genes calmodulina (**A**) con los cebadores CL1/CL2A y  $\beta$ -tubulina (**B**) con los cebadores Bt2a/Bt2b de algunas de las cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* utilizadas en los ensayos *in vitro*. Línea C (-): control negativo sin ADN, M: Marcador de peso molecular (Marcador DNA Ladder Bio Labs New England Inc.)

Al determinar el porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas, con otras secuencias de especies de *Aspergillus* sección *Flavi* consideradas de referencia y disponibles en GeneBank, se logró identificar a las cuatro cepas como: *A. oryzae* (cepas AM1, AM2 y GM3) y *A. flavus* (cepa GM4). Los porcentajes de similitud obtenidos fueron mayores al 99% con valores de E=0. Cabe destacar que mediante la clasificación convencional estas cepas presentaban caracteres coincidentes con la especie *A. flavus*.

La diversificación de las especies de *Aspergillus* sección *Flavi*, hace muy dificultosa su identificación con los métodos morfológicos y fisiológicos convencionales, debido a que las características que las definen se encuentran muy solapadas. Los resultados de este trabajo, donde las metodologías convencionales de identificación no concuerdan con las moleculares, coinciden con los observados por otros autores (Giaj Merlera y col. 2015). Esto se debe a que varios caracteres morfológicos y/o fisiológicos son compartidos por especies diferentes; y además dentro de una misma especie, existe también mucha diversidad de caracteres entre las cepas analizadas. Es por este motivo que en la actualidad, se trata de efectuar estudios que incluyan metodologías morfológicas (forma, textura y color de conidios, estipes, vesículas, etc.), fisiológicas (crecimiento a distintas temperaturas y medios de cultivos), químicas (análisis de extrolitos) y genéticas (secuenciación de genes) (Samson y col. 2014).

Las especies *A. flavus* y *A. oryzae* están estrechamente relacionadas y, aunque varias líneas evidencian que *A. oryzae* es una variante morfológica de *A. flavus*, se sugiere que se mantengan como especies separadas debido a que se podrían generar posibles confusiones en las normativas de la industria alimentaria (Geiser y col. 1998). Con el objetivo de mejorar la identificación y entender la relación filogenética entre las especies de *Aspergillus* sección *Flavi* se han desarrollado varios métodos de tipificación molecular. Entre ellos, podemos mencionar el uso de los marcadores basados en secuenciación de regiones conservadas del ADN y los marcadores moleculares polimórficos (Hadrach y col. 2011).

En un trabajo realizado por Samson y col. (2014), se discuten diferentes aproximaciones para la identificación de especies del género *Aspergillus*. Estos autores realizan recomendaciones para identificar y caracterizar a estas especies, informando marcadores de ADN confiables para una identificación certera. Estos marcadores deben utilizar cebadores universales, ser fáciles de amplificar y deben distinguir entre todas las especies. Basados en estos criterios concluyen que los marcadores de ADN adecuados para una correcta identificación y también para el análisis filogenético de estas especies son las secuencias parciales del gen de la calmodulina y  $\beta$ -tubulina. Estos marcadores han sido utilizados en

varios trabajos para la identificación correcta de las especies de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de diversos sustratos (Pildain y col. 2008; Varga y col. 2011; Gonçalves y col. 2012).

En el presente trabajo se logró la identificación definitiva de las cepas no toxicogénicas de la sección *Flavi* en estudio mediante la utilización de los marcadores propuestos por los autores antes mencionados.

## I.VI- Conclusiones

En base a la evaluación y discusión de los resultados de este capítulo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- En los suelos agrícolas expuestos reiteradamente a pesticidas, se aíslan una amplia variedad de géneros fúngicos. *Aspergillus* spp. es uno de los géneros fúngicos más frecuentes de la micobiota cultivable, seguido por Micelio estéril, *Trichoderma* spp. y *Cladosporium* spp., entre otros.
- Los géneros fúngicos aislados en mayor frecuencia en las muestras de suelo sin exposición a pesticidas fueron *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. y el grupo de hongos denominado Micelio estéril; los cuales fueron encontrados con una frecuencia mayor al 60%, seguidos por *Cladosporium* spp., Zygomycetes en general y *Alternaria* spp. Otros géneros como *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Talaromyces* spp., *Aspergillus* sección *Flavi*, *Aureobasidium* spp., *Rhizopus* spp., *Acremonium* spp. y *Paecilomyces* spp fueron aislados en muy baja frecuencia.
- En cuanto a los géneros fúngicos aislados en el suelo agrícola sin exposición a pesticidas se observó que sólo algunos de ellos coincidieron con los aislados en el muestreo de suelo agrícola expuesto a pesticidas. *Trichoderma* spp. y el grupo Micelio estéril fueron algunos de los géneros aislados con mayor frecuencia en el suelo sin exposición y también en el suelo expuesto a pesticidas.
- Es importante destacar que especies de *Aspergillus* sección *Flavi* se aislaron en alta frecuencia sólo en los suelos expuestos a pesticidas y *Acremonium* spp. de los suelos sin exposición.
- Se aislaron un total de 42 cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi*, de las cuales 34 se identificaron morfológicamente como *A. flavus* y el resto como *A. parasiticus*. De la totalidad de las cepas, el 98% resultó productora de AFB<sub>1</sub> y/o ACP siendo el 31% productoras de ambas micotoxinas (quimiotipo I), mientras que, el 45% fue

productora solo de AFB<sub>1</sub> (III) y sólo el 2,4% produjo ACP (IV). La totalidad de las cepas de *A. parasiticus* aisladas fueron productoras de AFB<sub>1</sub> y no de ACP.

- Las cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* identificadas como *A. flavus* por metodología convencional al amplificar la secuencia del gen calmodulina y  $\beta$ -tubulina se identificaron como *A. flavus* (cepa GM4) y *A. oryzae* (cepas AM1, AM2 y GM3) con porcentajes de similitud mayores al 99% y valores de E=0 (cero).



# **CAPÍTULO II**

## Capítulo II. Tolerancia *in vitro* a glifosato y clorpirifós solos y en combinación por *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones ambientales

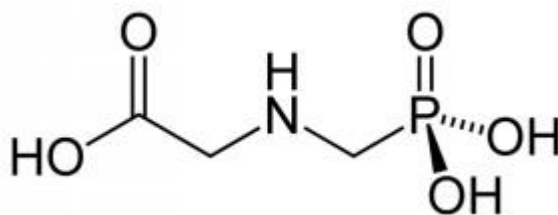
### II.I- Introducción

#### II.I.1- Pesticidas más usados en Argentina

##### II.I.1.1- Glifosato

##### II.I.1.1.1- Generalidades

El glifosato o PMG, técnicamente es N-fosfonometilglicina,  $C_3H_8NO_5P$ ; es el principio activo de numerosos herbicidas comerciales. Se formula junto a un surfactante como el POEA (polioxietil amina) (Roundup-nombre comercial de Monsanto). Pertenece al grupo de los organofosforados y se caracteriza por la presencia de una unión covalente y estable entre carbono y fósforo (C-P) (**Figura 11**). Este herbicida de uso habitual en Argentina y en el resto del mundo para eliminar malezas indeseables en ambientes agrícolas principalmente asociado a cultivos genéticamente modificados (como cultivos de maíz, soja y maní), barbechos químicos en cultivos sensibles (como trigo) y ambientes no agrícolas (espacios verdes y jardines) (CASAFE 2005). Desde el punto de vista químico, el glifosato es un herbicida bipolar, fácilmente ionizable en solución acuosa y se comporta como un ácido débil (Martino 1995; Prata y col. 2000).



**Figura 11:** Estructura química del glifosato.

##### II.I.1.1.2- Dosis aplicadas

En general, las dosis recomendadas varían de 1,4 a 2 Kg/ha. Estas dosis son estimativas pudiendo ser mayores de acuerdo al tipo de maleza que se debe eliminar y al estado del lote donde está el cultivo (Monsanto 2018).

### **II.I.1.1.3- Mecanismo de acción**

El glifosato es un herbicida post-emergente, sistémico, de amplio espectro y no selectivo con una actividad alta sobre numerosas malezas (anuales, perennes, mono o dicotiledóneas), siendo solamente resistentes aquellas variedades modificadas genéticamente (Duke y Powles 2008).

El carácter sistémico del glifosato permite que el producto, luego de ser absorbido por el follaje, se distribuya a la planta entera a través de los tallos y raíces. Es particularmente efectivo porque la mayoría de las plantas lo metabolizan muy lentamente o no lo degradan, lo que explica su acción no-selectiva. A pesar de esto, se han detectado residuos de glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA), principal metabolito de degradación del glifosato, en cultivos celulares de soja, en plantas y frutos de frutilla y de árboles forestales. En las plantas susceptibles, el herbicida no es ni degradado ni metabolizado significativamente (Prata y col. 2003).

El glifosato es el único herbicida que actúa inhibiendo la enzima 3-enolpiruvil-siquimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS), localizada en el cloroplasto, perteneciente a la ruta del ácido siquímico (siquimato) lo que produce acumulaciones de ácido siquímico y sus derivados. La inhibición de la enzima EPSPS impide la síntesis del ácido corísmico (corismato) el cual se requiere para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. Estos aminoácidos esenciales son utilizados para la síntesis de proteínas y de algunos productos secundarios tales como promotores e inhibidores del crecimiento, compuestos fenólicos y lignina (Bai y Ogbourne 2016). La resistencia de algunos cultivos a este pesticida se debe por ejemplo, en el caso de la soja transgénica, a una integración estable de un transgen de *Agrobacterium* spp. que codifica la EPSPS resistente, manteniendo de esta manera niveles normales de aminoácidos aromáticos en la planta (Martínez y col. 2004).

### **II.I.1.1.4- Comportamiento y persistencia del glifosato en el suelo**

Los impactos del glifosato en los organismos no blanco parecen ser insignificantes porque el glifosato es rápidamente adsorbido a las partículas del suelo donde su actividad es limitada, mientras que el glifosato libre es rápidamente degradado por los microorganismos (Giesy y col. 2000; Zhou y col. 2004). A pesar de su solubilidad elevada (10,5 g/L), la adsorción del glifosato a las partículas del suelo es significativa. Este hecho prácticamente eliminaría el riesgo de la presencia de residuos que puedan afectar las siembras posteriores

y la penetración por las raíces de los cultivos ya establecidos con las dosis recomendadas. Sin embargo, la inactivación de éste pesticida no es constante, debido a que se observaron daños en algunas especies de plantas producidos por su actividad residual. La vida media del glifosato y el AMPA en suelo varía entre 0,8 a 151 y 10 a 98 días, respectivamente. Estos rangos de persistencia tanto de glifosato como de AMPA en suelo resultan relativamente extensos debido a que varían de acuerdo a las propiedades del mismo y a las condiciones ambientales. Una prolongada vida media y una degradación lenta pueden incrementar el riesgo de contaminación ambiental a largo plazo, particularmente cuando se realizan aplicaciones repetitivas del herbicida como ocurre durante el manejo agrícola actual (Bai y Ogbourne 2016). Uno de los principales problemas son los residuos remanentes de herbicidas que se acumulan, en particular luego de veranos secos, debido a que la degradación de los pesticidas es más lenta en estas condiciones. Esta situación puede llegar a representar un riesgo de fitotoxicidad para los cultivos siguientes y sobre la microbiota del suelo. Además, varios investigadores afirman que el glifosato se puede desorber fácilmente en algunas clases de suelo, liberándose de las partículas, movilizándose en el mismo y quedando disponible durante un tiempo (Damalas y Eleftherohorinos 2011; Huber 2012; Todorovic y col. 2014). La retención del herbicida en el suelo es el principal proceso que regula su movilidad. Las diferentes características físico-químicas de los suelos juegan un rol esencial en su adsorción, en particular su pH y su tenor de Fe, Al, Ca,  $P_2O_5$  y materia orgánica (sobre todo en los suelos pobres en óxidos) (Zhou y col. 2004; Lupi y col. 2015). Esta fuerte adsorción se opone a la degradación que es esencialmente de naturaleza biológica y puede dar lugar a persistencias relativamente largas. Sin embargo, ésta depende de la adsorción pero también de las condiciones ambientales presentes (precipitaciones, temperatura, actividad microbiana, entre otros factores) (Barja y dos Santos Afonso 2005; Yang y col. 2015).

Los residuos que provienen de las malezas tratadas así como el glifosato exudado por las plantas al suelo, representan un pool adicional potencial de acumulación y estabilización del herbicida en los suelos (Reddy y col. 2004). Se dispone de poca información sobre el destino del glifosato unido a los residuos de las plantas. Existen estudios en soja y maíz que demuestran que la mineralización del glifosato se ve afectada por la temperatura, el origen de los rastrojos y la edad del residuo (Rampoldi y col. 2011). La unión entre el pesticida y los rastrojos del cultivo es marcadamente menor que con las partículas del suelo, lo que incrementa los riesgos ambientales potenciales como el escurrimiento superficial del herbicida hacia los cursos de agua (Accinelli y col. 2005; Rampoldi y col. 2011).

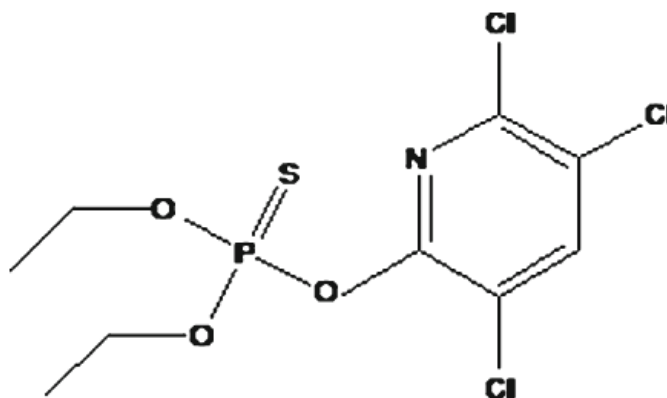
En Argentina algunos investigadores estudiaron los niveles de glifosato y AMPA tanto en suelo como en aguas superficiales en zonas agrícolas de la provincia de Buenos Aires. Peruzzo y col. (2008) informaron valores de glifosato en agua superficial cercana a campos cultivados del norte de la provincia de Buenos Aires entre 0,1 y 0,7 mg/L, mientras que en los sedimentos y en el suelo los niveles de este herbicida variaron entre 0,5 y 5 mg/Kg. Estos autores observaron una variación temporal en los niveles de glifosato detectados debidas directamente al momento de aplicación del herbicida y a las precipitaciones. En otro trabajo, Aparicio y col. (2013) detectaron niveles entre 35 y 1502 µg/Kg de glifosato y valores entre 299 y 2256 µg/Kg de AMPA en suelos cultivados. Estos autores analizaron además muestras de agua superficial, partículas en suspensión y sedimento. Los niveles de glifosato y AMPA encontrados en estas muestras fueron menores con respecto a los detectados en suelo. En un trabajo más reciente, Lupi y col. (2015) también analizaron niveles de glifosato y AMPA en suelo, agua y sedimento. Estos autores informaron niveles de glifosato en suelo previos a la aplicación del herbicida entre 0,1 y 0,2 µg/g, mientras que luego de la aplicación del mismo estos niveles se incrementaron. Además observaron que tanto las concentraciones de glifosato como de AMPA fueron menores en aquellas muestras tomadas a mayor profundidad del suelo. En cuanto a los sedimentos, estos autores informaron niveles de herbicida menores con respecto al suelo (0,0053 a 0,0263 µg/g); mientras que en aguas superficiales se detectó en mayor medida AMPA siendo los valores detectados de hasta 0,5 ng/mL.

### II.1.1.2- Clorpirifós

#### II.1.1.2.1- Generalidades

El clorpirifós ( $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ ), técnicamente O-O dietil O-3,5,5-tricloro-2-piridil fosfotriónato (**figura 12**) es un insecticida organofosforado de aplicación foliar o edáfica. Es un insecticida de amplio espectro, utilizado para combatir efectivamente insectos que afectan a cultivos importantes económicamente (Silambarasan y Abraham 2013).

Es uno de los pesticidas más frecuentemente detectados en aguas superficiales y subterráneas en el mundo (USGS 2000; Domagalski y Munday 2003). Este insecticida no se disuelve fácilmente en agua y puede adsorberse a partículas en suspensión y sedimentos.



**Figura 12:** Estructura química del clorpirifós

#### **II.I.1.2.2- Dosis aplicadas**

Las dosis que se aplican dependerán del cultivo a proteger, el insecto peste a controlar y la formulación del producto. Las dosis recomendadas a aplicar en suelo para el cultivo de maíz varían de 1,25 a 4 L/ha. Mientras que para la aplicación del insecticida cuando se visualizan los insectos o los síntomas que causan, las dosis recomendadas para el cultivo de maíz varían de 0,3 a 1,6 L/ha y para la soja el rango varía de 0,4 a 1,8 L/ha (Nufarm 2018).

#### **II.I.1.2.3- Mecanismo de acción**

El clorpirifós es un insecticida no sistémico, efectivo contra un amplio rango de insectos peste de cultivos económicamente importantes (Fang y col. 2006). Ingresa al cuerpo de los insectos por contacto e ingestión, siendo también absorbido por el intestino, la piel y las membranas pulmonares (Simon y col. 1998). Generalmente afecta el sistema nervioso de los insectos blancos inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa por fosforilación de la misma, tanto en la sinapsis de las neuronas como en el plasma (Hui y col. 2010). Como resultado de esto, se acumula acetilcolina en la sinapsis de las neuronas causando la muerte de los insectos blanco.

#### **II.I.1.2.4- Comportamiento y persistencia en el suelo**

El destino final del clorpirifós no sólo está afectado por sus propiedades fisicoquímicas, sino también por las características del suelo, el manejo y las condiciones ambientales (Halimah y col. 2010). Este insecticida posee una baja solubilidad en agua (2 mg/L a 25°C) y

una vida media de entre 10 a 120 días en suelo (Briceño y col. 2012). La variación de la misma puede ser atribuida a la variación de factores como pH, temperatura, contenido de humedad, contenido de carbono orgánico y formulación del pesticida (Álvarez y col. 2013). En general, la vida media de disipación es significativamente más larga en suelos orgánicos que en suelos minerales. La hidrólisis es más lenta en agua que contiene minerales de hierro arcillosos, sedimentos humanos, materia orgánica disuelta y sedimentos en suspensión (Gebremariam y col. 2012). Debido a su baja tasa de degradación y al uso continuo en la agricultura, el clorpirifós puede persistir por largos períodos de tiempo en el suelo lo cual incrementa el riesgo de contaminación del ambiente afectando a aquellas especies no blanco (Yadav y col. 2015). A las tasas termicidas, el clorpirifós se ha mantenido efectivo incluso por 5 a 17 años (Baskaran y col. 1999). Racke y col. (1994) informaron que la vida media de degradación del insecticida en 5 suelos diferentes a una concentración inicial de 1000 mg/L fue entre 175 y 1576 días. Otros datos mostraron que se mantenía estable incluso luego de los 12 meses de ser aplicado en el suelo (Gilani y col. 2010).

Los pesticidas en general se distribuyen en las fases sólidas, líquidas y gaseosas de la zona no saturada luego de su aplicación dependiendo de la constante de adsorción, desorción y volatilización (Marino y col. 2002; Gebremariam y col. 2012). Luego de cierto período de tiempo la mayor fracción del insecticida puede ser volatilizada, hidrolizada o biodegradada. Generalmente el clorpirifós reacciona con radicales hidroxilo producidos fotoquímicamente en la atmósfera y se degrada a oxon-clorpirifós con una vida media estimada de 4,2 horas. Los residuos de clorpirifós son considerados críticos ya que pueden permanecer por largos períodos de tiempo, dependiendo de la concentración inicial del pesticida y de la tasa de biodegradación (Surekha-Rani y col. 2008; Nawaz y col. 2011). Los residuos en el suelo pueden ser detectados a 20 cm de profundidad dentro del quinto al séptimo día de aplicación (Halimah y col. 2010). Además existen estudios que demuestran que tanto el clorpirifós como sus metabolitos de degradación se acumulan en varias plantas terrestres y acuáticas (John y Shaike 2015).

En Argentina hasta el momento no existen datos de los niveles de clorpirifós en suelos agrícolas. Pero sí existen estudios que reportan niveles detectables de clorpirifós en aguas superficiales y en sedimentos en la zona de La Pampa y Buenos Aires cercanas a campos cultivados (Jergentz y col. 2004; 2005; Marino y Ronco 2005). Los niveles encontrados por Marino y Ronco (2005) en sedimentos de aguas superficiales en La Pampa variaron entre 3,4 y 4,8 µg/Kg. En cuanto a los niveles de clorpirifós detectados en la provincia de Buenos Aires, Jergentz y col. (2004) reportaron valores medios en sedimentos de 150 µg/Kg;

mientras que en agua superficial y partículas en suspensión los niveles medios de insecticida informados fueron 0,3 y 7,7 µg/Kg. En otro trabajo, Jergentz y col. (2005) encontraron niveles más elevados de clorpirifós en partículas en suspensión en dos arroyos de la provincia de Buenos Aires, siendo el valor medio de 226 µg/Kg.

## **II.II- Hipótesis**

Las cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* son tolerantes bajo condiciones “*in vitro*” a los pesticidas clorpirifós y glifosato.

## **II.III- Objetivos**

- Realizar ensayos “*in vitro*” para determinar la tolerancia, de cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* no toxicogénicas, a diferentes dosis de clorpirifós y glifosato solos y en combinación, bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua.

## **II.IV- Materiales y métodos**

### **II.IV.1- Metodología**

#### **II.IV.1.1- Ensayos de tolerancia a glifosato**

##### **II.IV.1.1.1- En medio agar extracto de suelo (AES)**

Se seleccionaron 4 cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* (AM1; AM2; GM3; GM4) no productoras de AFs y ACP aisladas en muestreos anteriores de la misma zona a los realizados en el presente trabajo (Carranza y col. 2014a). Previamente, se desarrollaron en AEM durante 7 días a 25°C. Se prepararon placas de Petri conteniendo agar extracto de suelo (AES) acondicionado a diferentes potenciales hídricos (MPa) (-0,70; -2,78; -7,06 y -10) mediante la adición de diferentes cantidades de ClNa (0,887, 3,55, 7 y 13,5 g/100 mL respectivamente). Se eligieron valores de MPa que representen: condiciones óptimas del crecimiento fúngico (-0,70), condiciones de marchitez para las plantas (-2,78) y condiciones de estrés osmótico (-7,06 y -10). El MPa del medio de cultivo se corroboró utilizando un AquaLab Series 3 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA) al inicio y al final del ensayo con el objetivo de registrar cualquier cambio. Este medio de cultivo se preparó a partir de



caldo extracto de suelo (CES) realizado a partir de 500 g de suelo que se hidrataron con 1.000 mL de agua destilada. Luego de someti6 a vapor fluente 1 hora, se centrifug6 a 2.400 rpm por 20 minutos y se filtr6 utilizando filtros Whatman N° 1. Se complet6 el volumen nuevamente a 1.000 mL con agua destilada. A este caldo se adicionaron 20 g de agar-agar y se esteriliz6 en autoclave a 115°C durante 20 minutos (Fragoeiro y Magan 2005).

Adem6s, a cada tratamiento se le agregaron diferentes vol6menes de una soluci6n acuosa de glifosato (Roundup 1®) para llegar a las concentraciones finales en el medio de 5, 10, 15 y 20 mM). Estas concentraciones corresponden a dosis habitualmente utilizadas para el cultivo de soja y ma6z. Para cada condici6n de MPa se incluy6 el correspondiente control sin el agregado de pesticida.

A partir de cada cepa desarrollada en AEM se realiz6 una suspensi6n de conidios en agar semis6lido y desde aqu6 se inocularon las placas realizando una puncci6n central. Se incubaron a 25°C por 15 d6as en bolsas de polietileno para mantener constante la MPa. Se registr6 diariamente el crecimiento radial de las colonias (mm) en dos direcciones en un 6ngulo de 90°, el cual fue representado en funci6n del tiempo (d6as) para cada cepa y cada una de las condiciones de MPa y concentraci6n de herbicida ensayadas. Cada condici6n ensayada se realiz6 por triplicado y el ensayo se realiz6 dos veces. Los datos correspondientes a la fase de crecimiento lineal se ajustaron a una recta, calcul6ndose a partir de aqu6 la velocidad de crecimiento, expresada en mm/d6a. La fase de latencia para cada tratamiento se defini6 como el valor del eje X para un determinado Y, siendo 6ste valor, el radio de la colonia igual a 2 mm.

#### **II.IV.1.1.2- En medio a base de sustrato**

Se sigui6 la misma metodolog6a detallada en el punto **II.IV.1.1.1** con las mismas cepas seleccionadas pero el ensayo se realiz6 en el medio agar extracto de soja (AESO) (soja molida al 3%) acondicionado a dos  $a_w$  (0,995 y 0,98) mediante la adici6n de diferentes cantidades de glicerol (Dallyn y Fox 1980). A cada  $a_w$  se le adicion6 diferentes vol6menes de una soluci6n acuosa de glifosato (Roundup Ultramax®) para llegar a las concentraciones finales de glifosato en el medio de 100, 200, 300, 350, 400, 450 y 500 mM. Estas concentraciones corresponden a dosis m6s elevadas que las utilizadas para el cultivo de soja y ma6z, se corresponden con situaciones de derrame. Para cada condici6n de  $a_w$  se incluy6 el correspondiente control sin el agregado de pesticida. Cada tratamiento se realiz6 por triplicado y el ensayo se realiz6 dos veces. La evaluaci6n de los resultados se realiz6 de

la misma manera que en el punto **II.IV.1.1.1** y además se determinó la concentración de glifosato que provocó la reducción del 50% del crecimiento con respecto al control (DL50)

#### **II.IV.1.1.3- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno**

Se prepararon placas de Petri con el medio de cultivo Agar Czapeck (CZ), el cual fue previamente modificado reemplazando la sacarosa por glifosato a una concentración final de 10 mM para evaluar si el pesticida puede ser utilizado como única fuente de carbono. Para evaluar la utilización del herbicida como única fuente de fósforo y nitrógeno, se reemplazó el  $K_2HPO_4$  y el  $NaNO_3$  del medio de cultivo por glifosato a una concentración final de 1,0 y 1,5 mM, respectivamente (Krzysko-Lupicka y Sudol 2008). El medio de cultivo en el que se reemplazó la fuente de carbono recibió la nomenclatura CZC, mientras que los medios en los que se reemplazó la fuente de fósforo y la fuente nitrogenada se denominaron CZP y CZN respectivamente. Además se incluyeron controles en el medio CZ completo y en el medio agar agua (AA). Cada condición ensayada se realizó por triplicado y el ensayo se realizó dos veces.

La inoculación, incubación y evaluación de los resultados se realizó de la misma manera que en el punto **II.IV.1.1.1**

#### **II.IV.1.2- Ensayos de tolerancia a clorpirifós**

##### **II.IV.1.2.1- En medio agar extracto de suelo (AES)**

Para este ensayo se siguió la metodología detallada en el punto **II.IV.1.1.1** con la diferencia que a cada tratamiento se le agregaron diferentes volúmenes de una solución acuosa de clorpirifós (Hor-tal®) para llegar a las concentraciones finales en el medio de 5, 10, 15 y 20 mg/L). Estas concentraciones corresponden a dosis habitualmente utilizadas para el cultivo de soja y maíz. Para cada condición de MPa se incluyó el correspondiente control sin el agregado de pesticida. Cada condición ensayada se realizó por triplicado y el ensayo se realizó dos veces.

La inoculación, incubación y evaluación de los resultados se realizó de la misma manera que en el punto **II.IV.1.1.1**

##### **II.IV.1.2.2- En medio a base de sustrato**

Se siguió la misma metodología detallada en el punto **II.IV.1.1.2** En este caso el ensayo se realizó en el medio agar extracto de soja (AESO) acondicionado a dos  $a_w$  (0,995 y 0,980) mediante la adición de diferentes cantidades de glifosato. A cada  $a_w$  se le adicionó diferentes volúmenes de una solución acuosa de clorpirifós (Hor-tal®) para llegar a las concentraciones finales de glifosato en el medio de 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 mg/L. Estas concentraciones corresponden a dosis más elevadas que las utilizadas para el cultivo de soja y maíz, se corresponden con situaciones de derrame. Para cada condición de  $a_w$  se incluyó el correspondiente control sin el agregado de pesticida. Cada tratamiento se realizó por triplicado y el ensayo se realizó dos veces.

La evaluación de los resultados se realizó de la misma manera que en el punto **II.IV.1.1.2**.

#### **II.IV.1.2.3. Evaluación de la capacidad de utilizar clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno**

Se prepararon placas de Petri con el medio de cultivo agar Czapeck (CZ), el cual fue previamente modificado reemplazando la sacarosa por clorpirifós a una concentración final de 10 mM para evaluar si el pesticida puede ser utilizado como única fuente de carbono. Para evaluar la utilización del insecticida como única fuente de fósforo y nitrógeno, se reemplazó el  $K_2HPO_4$  y el  $NaNO_3$  del medio de cultivo por clorpirifós a una concentración final de 1,0 y 1,5 mM, respectivamente (Krzysko-Lupicka y Sudol 2008). El medio de cultivo en el que se reemplazó la fuente de carbono recibió la nomenclatura CZC, mientras que los medios en los que se reemplazó la fuente de fósforo y la fuente nitrogenada se denominaron CZP y CZN, respectivamente. Además se incluyeron controles en el medio CZ completo y en el medio agar agua (AA). Cada condición ensayada se realizó por triplicado y el ensayo se realizó dos veces.

La inoculación, incubación y evaluación de los resultados se realizó de la misma manera que en el punto **II.IV.1.1.3**.

#### **II.IV.1.3- Evaluación *in vitro* de la tolerancia a diferentes dosis combinadas de glifosato y clorpirifós por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* no toxicogénicas en medio a base de sustrato**

Para este ensayo se siguió la metodología detallada en el punto **II.IV.1.1.2** Como medio de cultivo se utilizó AESO acondicionado a dos  $a_w$  (0,995 y 0,980) mediante la adición de diferentes cantidades de glicerol. Además, a cada tratamiento se le agregaron diferentes

volúmenes de una solución acuosa comercial de glifosato (Roundup Ultramax®) y clorpirifós (Hor-tal®) para llegar a las concentraciones finales en el medio de 100, 300, 400 y 500 mM de glifosato y de 0,3; 0,8; 1,4 y 2 mM de clorpirifós. Las concentraciones utilizadas se eligieron según los resultados de los ensayos de tolerancia para cada pesticida en particular. Las combinaciones utilizadas fueron:

- C0:** sin pesticidas
- C1:** 100 mM de glifosato + 0,3 mM de clorpirifós
- C2:** 100 mM de glifosato + 0,8 mM de clorpirifós
- C3:** 100 mM de glifosato + 1,4 mM de clorpirifós
- C4:** 100 mM de glifosato + 2 mM de clorpirifós
- C5:** 300 mM de glifosato + 0,3 mM de clorpirifós
- C6:** 300 mM de glifosato + 0,8 mM de clorpirifós
- C7:** 300 mM de glifosato + 1,4 mM de clorpirifós
- C8:** 300 mM de glifosato + 2 mM de clorpirifós
- C9:** 400 mM de glifosato + 0,3 mM de clorpirifós
- C10:** 400 mM de glifosato + 0,8 mM de clorpirifós
- C11:** 400 mM de glifosato + 1,4 mM de clorpirifós
- C12:** 400 mM de glifosato + 2 mM de clorpirifós
- C13:** 500 mM de glifosato + 0,3 mM de clorpirifós
- C14:** 500 mM de glifosato + 0,8 mM de clorpirifós
- C15:** 500 mM de glifosato + 1,4 mM de clorpirifós
- C16:** 500 mM de glifosato + 2 mM de clorpirifós

Para cada condición de  $a_w$  se incluyó el correspondiente control sin el agregado de los pesticidas. La inoculación, incubación y evaluación de los resultados se realizó siguiendo la metodología detallada en el punto **II.IV.1.2**

#### **II.IV.1.4- Análisis estadístico de los datos**

Los análisis de los datos se realizaron mediante el análisis de varianza. La prueba de Fisher (LSD) fue utilizada para determinar las diferencias significativas entre los parámetros de crecimiento evaluados. Los datos (fase lag y velocidad de crecimiento) fueron sometidos a un análisis de varianza para obtener el efecto de un factor simple (cepa), de dos factores (cepa x  $a_w$  o MPa /cepa x concentración de pesticida) y de tres factores (cepa x  $a_w$  o MPa x

concentración de pesticida). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat, 2010p de la Universidad Nacional de Córdoba.

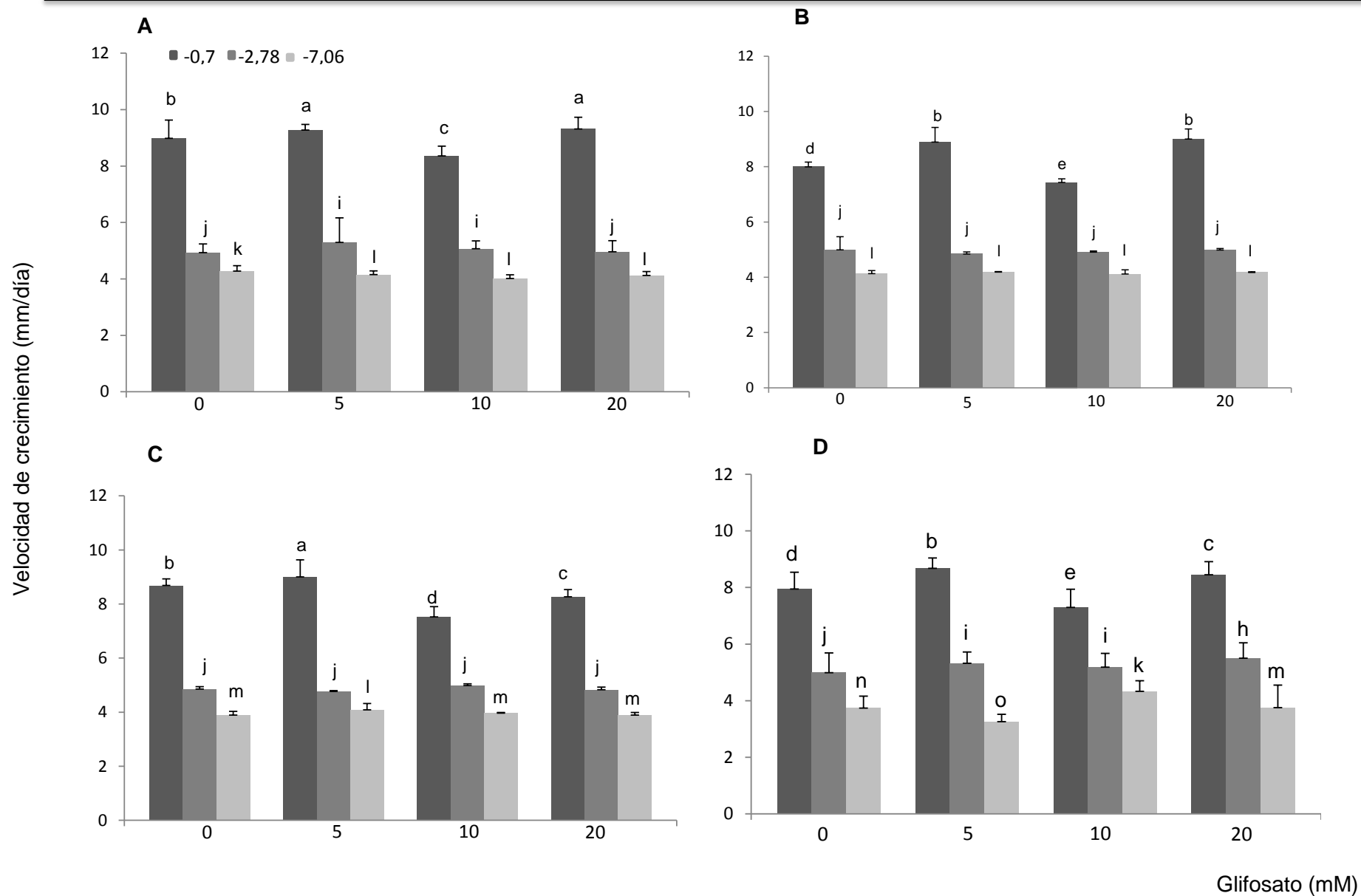
## **II.V- Resultados y discusión**

### **II.V.1- Evaluación *in vitro* de la tolerancia a glifosato y clorpirifós solos y en combinación por *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones de incubación**

#### **II.V.1.1- Ensayos de tolerancia a glifosato**

##### **II.V.1.1.1- En medio agar extracto de suelo (AES)**

Cuando se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la velocidad de crecimiento de cuatro cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* (AM1, AM2, GM3 y GM4), se observó que en los tratamientos controles a medida que disminuyó la MPa del medio, la velocidad de crecimiento radial de todas las cepas fúngicas se redujo notablemente. En los tratamientos con glifosato, este comportamiento no fue observado con concentraciones crecientes del mismo. En general, la velocidad de crecimiento radial de todas las cepas ensayadas permaneció constante con el aumento de la concentración del herbicida; sólo en algunos casos particulares se pudo observar un aumento en la velocidad de crecimiento a medida que la concentración de glifosato se incrementó. En todas las cepas, a -0,70 de MPa, la velocidad de crecimiento radial aumentó significativamente con el agregado de 5 y 20 mM de glifosato con respecto a los tratamientos controles ( $p < 0,0001$ ) (Figura 13).



**Figura 13:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial de *A. sección Flavi*: cepa AM1 (A); AM2 (B); GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AES bajo distintos valores de MPa. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD.

A -2,78 de MPa, la velocidad de crecimiento permaneció constante en todas las concentraciones de herbicida ensayadas, excepto en la cepa GM4 (**Figura 13D**) en la cual se observó una relación directamente proporcional entre el aumento de la misma y el incremento de la concentración de glifosato ( $p < 0,0001$ ).

Cuando se analizaron las velocidades de crecimiento radial de las cepas ensayadas a -7,06 MPa, se determinó que en general las mismas no se vieron modificadas por el agregado de diferentes concentraciones de herbicida, con excepción de la cepa GM3 a 5 mM y en la cepa GM4 a 10 y 20 mM de glifosato (**Figura 13C y D**); en las cuales se evidenció un incremento en la velocidad de crecimiento radial de las mismas ( $p < 0,0001$ ). Al menor potencial hídrico ensayado (-10) no se observó desarrollo en ninguno de los tratamientos durante todo el período de incubación (dato no mostrado).

En la **tabla 5** se muestra el efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la fase de latencia (hs) de diferentes cepas de *A. sección Flavi* ensayadas a tres valores de MPa. En concordancia con los resultados obtenidos de la velocidad de crecimiento radial, a medida que se redujo el MPa aumentó significativamente la fase de latencia previa al crecimiento. Este comportamiento fue más notorio al más bajo MPa ensayado, donde la fase de latencia se extendió por más de 360 horas (15 días) (dato no mostrado). Por otro lado, en general, la fase de latencia de las diferentes cepas se mantuvo constante con el sucesivo incremento del herbicida. Además, en algunos casos se evidenció una relación inversamente proporcional entre el aumento de glifosato y la disminución de la fase de latencia previa al crecimiento.

En todos los MPa evaluados y con la adición de 20 mM de glifosato, se observó una disminución significativa en la fase de latencia con respecto a los tratamientos controles en las cuatro cepas de *A. sección Flavi* ensayadas. La reducción más significativa se observó en las cepas GM3 y GM4 a -7,06 MPa, (de 45 a 37 horas y de 42 a 36 hs, respectivamente) ( $p < 0,0001$ ). Como particularidad, con el agregado de 5 y 10 mM de glifosato y a -2,78 MPa, las cepas AM1 y GM3 presentaron un aumento significativo en su fase de latencia previa al crecimiento ( $p < 0,0001$ ).

**Tabla 5:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la fase de latencia (hs) de *A. sección Flavi* (AM1; AM2; GM3; GM4) en el medio AES bajo diferentes condiciones de MPa y a 25 °C.

Cepas	MPa	Fase de latencia (hs) $\pm$ DE			
		(Glifosato) (mM)			
		0	5	10	20
AM1	-0,70	24 $\pm$ 0,26 <sup>l</sup>	21 $\pm$ 0,24 <sup>n</sup>	23 $\pm$ 0,35 <sup>l</sup>	20 $\pm$ 0,22 <sup>o</sup>
	-2,78	44 $\pm$ 2,63 <sup>b</sup>	46 $\pm$ 9,41 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 2,26 <sup>b</sup>	43 $\pm$ 5,71 <sup>b</sup>
	-7,06	40 $\pm$ 2,97 <sup>e</sup>	34 $\pm$ 5,69 <sup>h</sup>	37 $\pm$ 2,96 <sup>f</sup>	40 $\pm$ 5,69 <sup>e</sup>
AM2	-0,70	24 $\pm$ 0,27 <sup>l</sup>	23 $\pm$ 0,19 <sup>l</sup>	23 $\pm$ 0,36 <sup>l</sup>	20 $\pm$ 0,23 <sup>o</sup>
	-2,78	23 $\pm$ 7,86 <sup>l</sup>	20 $\pm$ 5,17 <sup>o</sup>	21 $\pm$ 1,07 <sup>n</sup>	21 $\pm$ 1,41 <sup>n</sup>
	-7,06	44 $\pm$ 3,98 <sup>b</sup>	39 $\pm$ 5,94 <sup>ef</sup>	40 $\pm$ 1,81 <sup>e</sup>	39 $\pm$ 2,38 <sup>ef</sup>
GM3	-0,70	22 $\pm$ 0,29 <sup>m</sup>	22 $\pm$ 0,14 <sup>m</sup>	20 $\pm$ 0,56 <sup>o</sup>	20 $\pm$ 0,63 <sup>o</sup>
	-2,78	28 $\pm$ 11,61 <sup>j</sup>	25 $\pm$ 13,41 <sup>kl</sup>	31 $\pm$ 12,31 <sup>i</sup>	25 $\pm$ 12,77 <sup>kl</sup>
	-7,06	45 $\pm$ 12,12 <sup>ab</sup>	38 $\pm$ 3,58 <sup>f</sup>	36 $\pm$ 2,58 <sup>g</sup>	37 $\pm$ 4,52 <sup>f</sup>
GM4	-0,70	20 $\pm$ 0,30 <sup>o</sup>	18 $\pm$ 0,84 <sup>op</sup>	21 $\pm$ 0,22 <sup>n</sup>	19 $\pm$ 0,09 <sup>o</sup>
	-2,78	29 $\pm$ 0,80 <sup>j</sup>	26 $\pm$ 0,22 <sup>k</sup>	29 $\pm$ 0,41 <sup>j</sup>	26 $\pm$ 0,26 <sup>k</sup>
	-7,06	42 $\pm$ 24,25 <sup>d</sup>	39 $\pm$ 0,49 <sup>ef</sup>	37 $\pm$ 0,43 <sup>f</sup>	36 $\pm$ 0,12 <sup>g</sup>

Los valores medios (cuadruplicados) con letras diferentes son estadísticamente significativos según el Test de LSD ( $p < 0,0001$ ).

Cada uno de los factores analizados, por si solos y la interacción de ellos, influyen significativamente sobre la velocidad de crecimiento radial y la fase de latencia previa al crecimiento (**Tabla 6**).



**Tabla 6:** Análisis de la varianza del efecto del potencial hídrico (MPa), concentración de glifosato (C), diferentes cepas (I) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. sección Flavi* sobre el medio agar extracto de suelo.

Fuente de variación	df <sup>†</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
		MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>	MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
I	3	47,48	15766,59*	118450,01	10,26*
C	3	399,16	99999,99*	17221796,97	1491,61*
MPa	2	40,54	13460,34*	1278241,00	110,71*
I x C	17	32,14	10671,62*	60035,76	5,20*
I x MPa	26	10,68	3546,52*	108999,45	9,44*
I x C x MPa	30	0,54	179,73*	103069,19	8,93*

<sup>†</sup> Grados de libertad.

<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

<sup>§</sup> F-Snedecor.

\* Significancia  $p < 0.0001$ .

#### II.V.1.1.2- En medio a base de sustrato

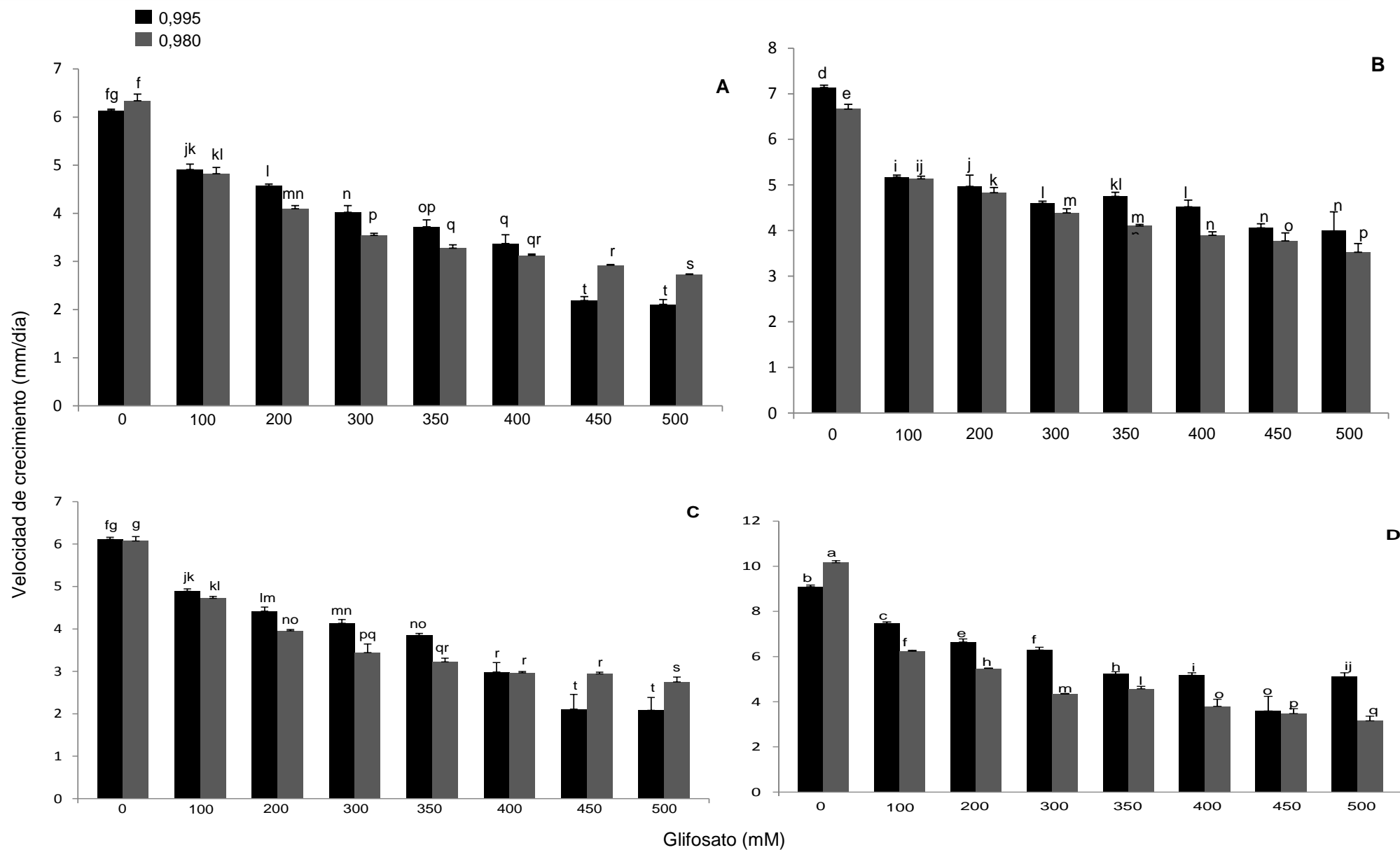
Los tratamientos en este ensayo fueron realizados en un medio formulado con sustrato natural y con concentraciones muy elevadas del herbicida con el fin de determinar la tolerancia de estas cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi* y así determinar que concentraciones reducen significativamente el crecimiento de ellas. Al igual que en el ensayo anterior (en el medio AES), se observó que en general en las 4 cepas ensayadas la velocidad de crecimiento se redujo cuando la  $a_w$  del medio disminuyó en los distintos tratamientos (**Figura 14**). Se evidenciaron algunas excepciones, tal como en las cepas AM1 y GM3 a 450 y 500 mM de glifosato y en la cepa GM4 en el tratamiento control, donde la velocidad de crecimiento fue mayor a 0,980 de  $a_w$ . Los resultados muestran que todas las cepas fueron capaces de crecer hasta la concentración más alta de glifosato ensayada (500 mM) independientemente de la condición de incubación.

En general a medida que aumentó la concentración de herbicida en el medio, la velocidad de crecimiento se redujo significativamente en ambas  $a_w$  ensayadas ( $p < 0,0001$ ), salvo algunas excepciones, donde se evidenció que a una misma  $a_w$  las velocidades de

crecimiento fueron similares en dos concentraciones distintas de glifosato. La concentración de herbicida que provocó el 50% de reducción en el crecimiento (DL 50) varió de acuerdo a la cepa ensayada. La cepa más tolerante al pesticida fue la AM2, ya que tuvo una DL 50 de más de 500 mM. Las cepas AM1 y GM3, a ambas  $a_w$ , tuvieron una DL 50 en el rango de 400-450 mM, al igual que la cepa GM4 a 0,995 de  $a_w$ . Esta última tuvo el valor más bajo de DL 50 a 0,980 de  $a_w$  (en el rango de 200-300 mM).

Con respecto a la fase de latencia, en concordancia con los resultados de velocidad de crecimiento, en general todas las cepas en todos los tratamientos evidenciaron una fase de latencia más larga cuando la  $a_w$  del medio fue menor (**Tabla 7**). También se observó que a medida que se incrementó la concentración de glifosato en el medio de cultivo, la fase de latencia aumentó, siendo el valor más alto (104,9 hs) en la cepa GM4 a 0,995 de  $a_w$  y a 450 mM de herbicida.

Cada uno de los factores analizados, por si solos y la interacción de ellos, influyen significativamente sobre la velocidad de crecimiento radial, mientras que los factores que influyen significativamente sobre fase de latencia previa al crecimiento son la concentración de glifosato, la actividad acuosa y las interacciones entre las cepas con estos dos factores (**Tabla 8**).



**Figura 14:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial de *A. sección Flavi*: cepa AM1 (A); AM2 (B); GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AESO bajo distintas condiciones de  $a_w$ . Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD.

**Tabla 7:** Efectos de diferentes concentraciones de glifosato sobre la fase de latencia (hs) de *A. sección Flavi* (AM1; AM2; GM3 y GM4) en el medio AESO bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y a 25 °C.

		Fase de latencia (hs)± DE							
Cepas	$a_w$	Glifosato (mM)							
		0	100	200	300	350	400	450	500
AM1	0,995	23,4 ± 3,1 <sup>lm</sup>	33,9 ± 2,8 <sup>k</sup>	39,7 ± 2,0 <sup>j</sup>	41,3 ± 2,0 <sup>ij</sup>	44,1 ± 4,4 <sup>i</sup>	55,6 ± 5,7 <sup>fg</sup>	71,3 ± 1,6 <sup>d</sup>	73,8 ± 3,9 <sup>cd</sup>
	0,980	28,7 ± 1,2 <sup>kl</sup>	39,4 ± 2,3 <sup>j</sup>	46,5 ± 4,1 <sup>hi</sup>	52,8 ± 6,6 <sup>g</sup>	51,3 ± 2,6 <sup>gh</sup>	53,7 ± 4,6 <sup>fg</sup>	56,2 ± 1,9 <sup>fg</sup>	58,7 ± 3,9 <sup>f</sup>
AM2	0,995	22,2 ± 0,9 <sup>m</sup>	28,7 ± 0,6 <sup>kl</sup>	39,2 ± 1,7 <sup>j</sup>	41,4 ± 1,4 <sup>ij</sup>	50,1 ± 5,0 <sup>h</sup>	52,4 ± 1,4 <sup>g</sup>	71,4 ± 4,7 <sup>d</sup>	85,0 ± 16,2 <sup>b</sup>
	0,980	27,2 ± 1,3 <sup>l</sup>	31,6 ± 0,9 <sup>k</sup>	43,1 ± 1,5 <sup>i</sup>	55,0 ± 7,9 <sup>fg</sup>	45,7 ± 1,9 <sup>hi</sup>	61,3 ± 8,1 <sup>ef</sup>	66,0 ± 8,1 <sup>e</sup>	81,0 ± 18,2 <sup>bc</sup>
GM3	0,995	27,0 ± 1,2 <sup>l</sup>	33,6 ± 1,1 <sup>k</sup>	46,3 ± 5,0 <sup>hi</sup>	49,8 ± 3,3 <sup>h</sup>	53,3 ± 1,6 <sup>g</sup>	61,9 ± 8,5 <sup>e</sup>	77,7 ± 15,1 <sup>cd</sup>	68,9 ± 5,3 <sup>de</sup>
	0,980	28,2 ± 3,3 <sup>l</sup>	35,5 ± 1,2 <sup>jk</sup>	44,7 ± 2,1 <sup>i</sup>	47,7 ± 1,3 <sup>h</sup>	50,6 ± 0,3 <sup>gh</sup>	51,2 ± 0,9 <sup>gh</sup>	58,3 ± 2,1 <sup>f</sup>	60,3 ± 7,8 <sup>ef</sup>
GM4	0,995	19,6 ± 0,38 <sup>mn</sup>	37,4 ± 1,01 <sup>jk</sup>	40,1 ± 5,08 <sup>j</sup>	38,9 ± 1,75 <sup>j</sup>	58,7±14,00 <sup>f</sup>	69,8 ± 5,02 <sup>de</sup>	104,9± 10,81 <sup>a</sup>	78,8 ± 4,60 <sup>c</sup>
	0,980	25,9 ± 0,93 <sup>lm</sup>	28,5 ± 0,34 <sup>l</sup>	30,9 ± 1,47 <sup>kl</sup>	45,6 ± 5,39 <sup>hi</sup>	42,0 ± 1,46 <sup>ij</sup>	57,6 ± 8,49 <sup>f</sup>	65,9 ± 5,65 <sup>e</sup>	70,4 ± 2,13 <sup>d</sup>

Los valores medios con letras diferentes son estadísticamente significativos según el Test de LSD ( $p < 0,0001$ ).

**Tabla 8:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C), diferentes cepas (I), y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. sección Flavi* sobre un medio agar extracto de soja.

Fuente de variación	df <sup>†</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
		MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>	MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
I	3	34,99	1367,41*	64,54	2,10
C	7	43,68	1706,76*	6793,40	220,83*
$a_w$	1	5,63	220,00*	455,31	14,80*
I x C	21	1,17	45,64*	180,63	5,87*
I x $a_w$	3	2,07	81,00*	400,97	13,03*
I x C x $a_w$	21	0,50	19,69*	62,02	2,02

<sup>†</sup> Grados de libertad.

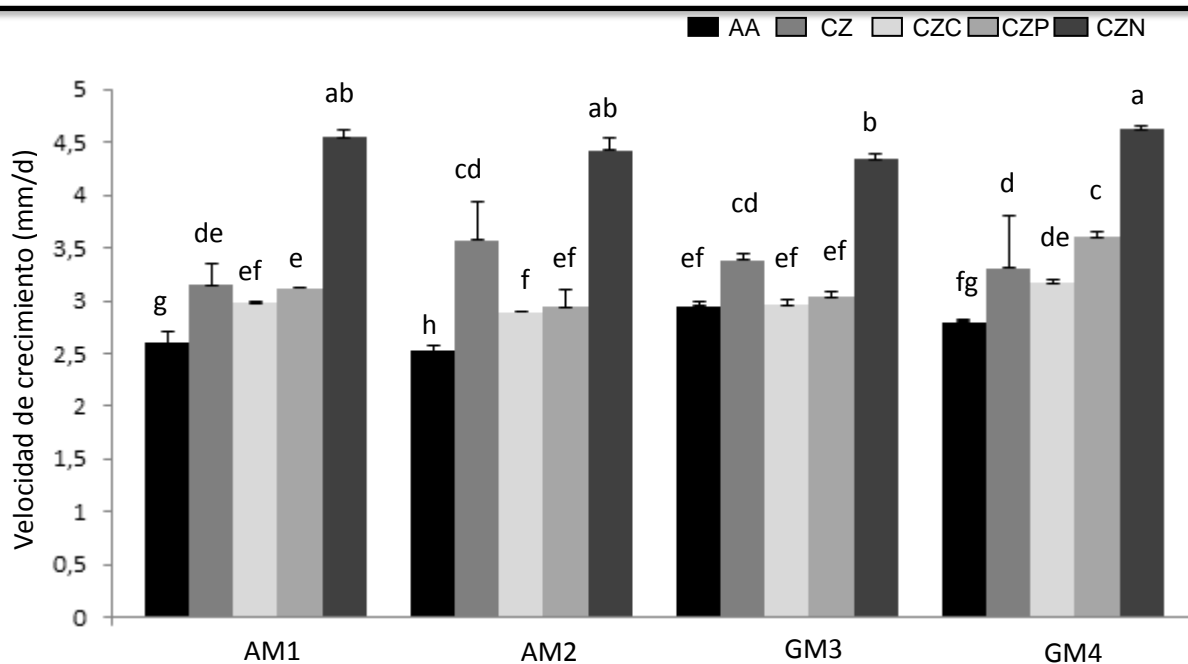
<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

<sup>§</sup> F-Snedecor.

\* Significancia  $p < 0,0001$

#### II.V.1.1.3- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno

Con respecto a la velocidad de crecimiento, todas las cepas de *A. sección Flavi* mostraron un comportamiento similar. En el medio adicionado con glifosato como fuente nitrogenada, se observó un incremento significativo de este parámetro (24 al 44%) comparado con el control (CZ) ( $p < 0,001$ ). En general, no se registraron diferencias significativas al comparar los medios adicionados con el herbicida como fuente de carbono y fósforo; excepto en la cepa GM4 donde se observaron valores de velocidad de crecimiento significativamente diferentes entre estos medios ( $p < 0,001$ ). Los valores más bajos de este parámetro, tal lo esperado, se encontraron en el medio AA (**Figura 15**).



**Figura 15:** Efecto del adicionado de glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno sobre la velocidad de crecimiento de cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi*. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) de acuerdo al test LSD.

La **tabla 9** muestra la fase de latencia de las cuatro cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi* ensayadas en los medios controles y en presencia de diferentes concentraciones de glifosato como única fuente de carbono, fósforo y nitrógeno. En general todas las cepas mostraron el mismo patrón de comportamiento en todos los medios ensayados. Las fases de latencia más cortas se observaron en el medio agar agua (AA) y en el medio Czapeck completo (CZ). Entre los medios suplementados con el herbicida, la menor fase de latencia se observó cuando el glifosato se agregó como fuente de nitrógeno. Sólo en la cepa GM4 se observaron diferencias significativas entre los medios donde el glifosato reemplazó la fuente carbonada, de fósforo y nitrógeno ( $p < 0,001$ ). Esta cepa mostró las mayores diferencias en este parámetro entre los medios CZC y CZN (38 y 29 hs, respectivamente).

Cada uno de los factores analizados, por si solos y la interacción de ellos, influyen significativamente sobre la velocidad de crecimiento radial de las cepas ensayadas. Por el contrario, el análisis de la varianza de estos factores sobre la fase latencia mostró que sólo el efecto de los medios de cultivo fue estadísticamente significativo en relación con la fase de latencia ( $p < 0,001$ ) (**Tabla 10**).

**Tabla 9:** Fase de latencia (hs) de cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi* en medios de cultivo sin glifosato y adicionados con el pesticida como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno.

Cepas	Fase de latencia (hs)±DE				
	AA	CZ	CZC	CZP	CZN
AM1	1,60 ± 2,24 <sup>de</sup>	16,10 ± 8,28 <sup>d</sup>	36,00 ± 0,90 <sup>ab</sup>	35,00 ± 0,29 <sup>b</sup>	31,00 ± 3,23 <sup>bc</sup>
AM2	8,90 ± 3,15 <sup>e</sup>	18,30 ± 8,53 <sup>d</sup>	32,00 ± 1,57 <sup>b</sup>	31,00 ± 4,40 <sup>bc</sup>	30,00 ± 3,00 <sup>bc</sup>
GM3	7,00 ± 1,69 <sup>e</sup>	16,20 ± 10,66 <sup>d</sup>	34,00 ± 1,17 <sup>b</sup>	32,00 ± 1,95 <sup>b</sup>	30,00 ± 1,37 <sup>bc</sup>
GM4	13,40 ± 3,06 <sup>de</sup>	17,70 ± 5,54 <sup>d</sup>	38,00 ± 0,65 <sup>a</sup>	34,00 ± 3,70 <sup>b</sup>	29,00 ± 1,72 <sup>c</sup>

Los valores medios (cuadruplicados) con letras diferentes son estadísticamente significativos según el Test de LSD ( $p < 0,0001$ ). AA: agar agua. CZ: agar Czapeck. CZC: agar Czapeck con glifosato como fuente de carbono. CZP: agar Czapeck con glifosato como fuente de fósforo. CZN: agar Czapeck con glifosato como fuente de nitrógeno.

**Tabla 10:** Análisis de la varianza del efecto de los medios de cultivo (M) y diferentes cepas (I), y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. sección Flavi* en diferentes medios adicionados con glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno.

Fuente de variación	df <sup>†</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
		MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>	MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
M	4	5,54	223,33*	1400,50	73,92*
I	3	0,17	7,01*	27,33	1,44
M x I	12	0,09	3,82*	9,20	0,49

<sup>†</sup> Grados de libertad.

<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

<sup>§</sup> F-Snedecor.

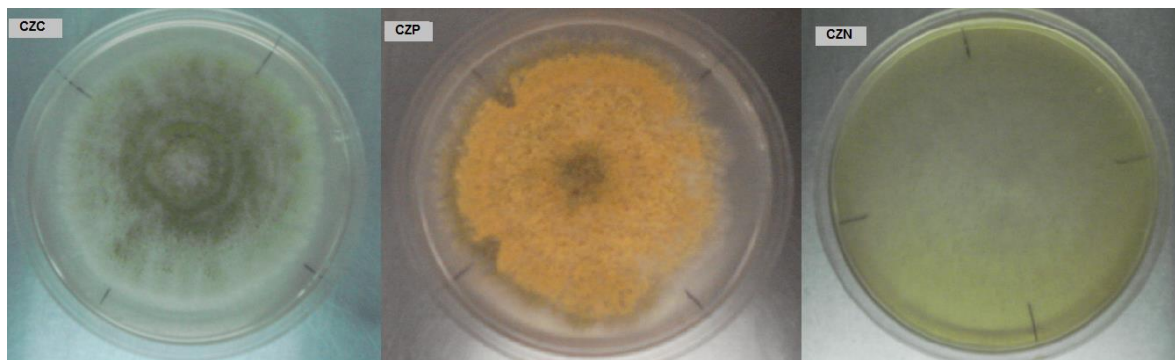
\* Significancia  $p < 0,001$

#### II.V.1.1.3.1- Características macroscópicas de las colonias en los medios suplementados con glifosato como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno

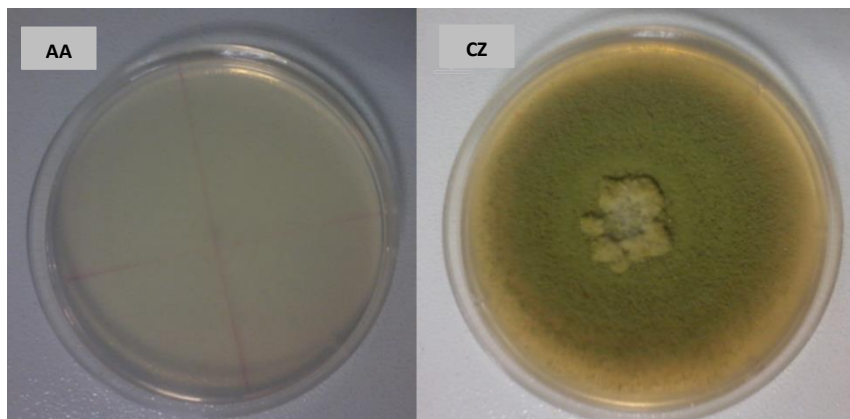
Se observaron cambios macroscópicos en las colonias desarrolladas en los distintos medios ensayados. Las colonias en el medio CZC eran planas con abundante micelio blanco en los márgenes. Sólo se observó una abundante esporulación color verde oliva en el centro de la colonia. Por el contrario, se observaron colonias velutinosas o ligeramente flocosas con abundante esporulación y escaso micelio blanco cuando el glifosato reemplazó la fuente de fósforo. El color de los conidios en este medio fue amarillo-dorado, lo cual es otra diferencia al comparar la coloración de los conidios en el medio CZP. En el medio CZN la morfología de las colonias resultó completamente diferente a la de las colonias en los otros medios de cultivo ensayados. En este medio, las colonias se observaron planas con escasa esporulación (**Figura 16A**). Al comparar la morfología de las colonias en los medios controles (CZ y AA), los cambios resultan aún más evidentes ya que como se muestra en la **figura 16B** las colonias en el medio CZ completo posee las características típicas de una cepa de *Aspergillus* de la sección *Flavi*: colonia velutinosa, algodonosa en el centro, abundante esporulación color verde-oliva y escaso micelio blanco en los márgenes. Mientras que en el medio agar-agua las colonias fueron planas con abundante micelio blanco y escasa esporulación, es decir, similares a las observadas en el medio CZN.



A



B



**Figura 16:** Efecto de la adición de glifosato como fuente de carbono (CZC), fósforo (CZP) y nitrógeno (CZN) sobre la morfología de la colonia de *A. oryzae* GM3 (A). Características morfológicas de las colonias de *A. oryzae* AM2 desarrolladas en el medio agar Czapeck (CZ) y en agar agua (AA) (B)

Mediante los ensayos de crecimiento *in vitro* se logró evaluar el efecto del herbicida glifosato aplicado en concentraciones crecientes, sobre la velocidad de crecimiento radial y la fase de latencia de cuatro cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi*, evaluándose también el efecto producido por diferentes condiciones de disponibilidad de agua sobre los parámetros de crecimiento ya mencionados.

En los tratamientos controles (sin el agregado de glifosato) se observó que a medida que disminuía la disponibilidad acuosa del medio de cultivo, la velocidad de crecimiento radial de todas las cepas fúngicas ensayadas se redujo notablemente. Por el contrario, este comportamiento no se detectó en el ensayo con el medio AES con el aumento en la concentración de glifosato ya que la velocidad de crecimiento permaneció constante. En algunos casos, se evidenció un aumento en la misma a medida que la concentración del herbicida se incrementaba. Mientras que con las mayores concentraciones utilizadas en el ensayo con el medio AESO, si se logró observar reducciones en la velocidad de crecimiento de más del 50% en algunos casos.

En la literatura son escasos los estudios donde se evalúa el efecto del glifosato sobre el crecimiento de cepas de la sección *Flavi* (Hasan 1999a; Reddy y col. 2007). Hasan (1999a), observó una disminución significativa en el crecimiento respecto a la del tratamiento control cuando una cepa toxicogénica de *A. parasiticus* desarrolló en el medio YES con concentraciones de glifosato (marca comercial Lancer) entre 50 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los informados por este autor y también con los informados por Reddy y col. (2007), quienes observaron que el crecimiento radial de dos cepas de *A. flavus*, en el medio agar agua disminuía un 50 y 80% con respecto al control con el agregado de 5 y 10 mM de glifosato, respectivamente. Además, en el medio complejo (agar papa glucosado) observaron una inhibición parcial y total del crecimiento sólo a 10 mM de glifosato. Mientras que, en este trabajo la velocidad de crecimiento de todas las cepas analizadas bajo un potencial hídrico de -0,70, aumentó significativamente con el agregado de 5 y 20 mM del herbicida con respecto a los controles. Las concentraciones del herbicida que lograron una reducción en el crecimiento radial como la informada por Reddy y col. (2007) en general variaron entre 400 a 500 mM en el ensayo realizado con el medio de cultivo AESO. A -2,78 MPa en el medio AES, en cambio, no se observó un cambio significativo en la velocidad de crecimiento en las distintas concentraciones de glifosato ensayadas, excepto para una de las cepas (GM4) en la cual se evidenció una relación directamente proporcional entre el aumento de la misma y el incremento de la concentración del herbicida. A -7,06 MPa las velocidades de crecimiento radial de todas las cepas permanecieron constantes a medida que la concentración de glifosato variaba, pero en la cepa GM3 se observó un aumento de la misma a una concentración de glifosato de 5 mM y lo mismo ocurrió con la cepa GM4 pero a una concentración de 10 y 20 mM del herbicida. Estos resultados coinciden parcialmente con los observados recientemente por Barberis y col. (2013), quienes observaron en cepas toxicogénicas de *A. flavus* desarrollando sobre un medio en base a maíz, que la tasa de crecimiento aumentaba significativamente con 5 y 10 mM de glifosato en todas las condiciones de  $a_w$  ensayadas.

En concordancia con lo observado con la velocidad de crecimiento radial, a medida que se redujo la disponibilidad acuosa, la fase de latencia previa al crecimiento aumentó significativamente tanto en el ensayo con el medio AES como con el medio AESO. Por otro lado, en general en el medio AES, la fase de latencia de las diferentes cepas se mantuvo constante con el sucesivo incremento del herbicida mientras que en el medio AESO con concentraciones mucho más elevadas de glifosato sí se observó un aumento significativo de la fase de latencia a medida que se incrementaba la concentración de herbicida. Además, en

algunos casos en el medio AES se evidenció una relación inversamente proporcional entre el aumento de glifosato y la disminución de la fase previa al crecimiento. A todos los MPa evaluados y con la adición de 20 mM de glifosato se observó una disminución significativa en la fase de latencia con respecto a los tratamientos controles en las cuatro cepas de *A. sección Flavi* ensayadas. Estos resultados coinciden también con los detectados recientemente con cepas toxicogénicas de *A. flavus*, donde se observó una disminución de la fase de latencia en determinadas concentraciones del herbicida (Barberis y col. 2013). En estudios previos realizados con otras especies fúngicas aisladas de suelo se informó que el efecto *in vitro* de este herbicida en el crecimiento depende de las concentraciones ensayadas. En otras especies fúngicas, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, el crecimiento no se vio afectado a bajas concentraciones de glifosato, mientras que a altas concentraciones se observó una inhibición significativa (Larson y col. 2006). Otros autores informaron también un incremento del crecimiento en medios adicionados con glifosato con cepas de *Trichoderma harzianum* y *Streptomyces* spp., entre otros (Wardle y Parkinson 1992; Obojska y col. 1999; Hanson y Fernandez 2003). Aunque estos trabajos fueron realizados con diferentes especies fúngicas y condiciones experimentales, los resultados son comparables a los informados en este estudio.

En cuanto a la capacidad de utilizar el glifosato, los resultados muestran que las cuatro cepas de *A. sección Flavi* no toxicogénicas ensayadas son capaces de desarrollar en un medio sintético adicionado con el herbicida como única fuente de carbono, fósforo y/o nitrógeno. Observando una considerable variación en la duración de la fase de latencia y la velocidad de crecimiento según el medio de cultivo considerado. La evaluación del primer parámetro sugiere que las cepas ensayadas un tiempo de adaptación mayor a 29 horas para desarrollar en un medio de cultivo con el herbicida como fuente de carbono, nitrógeno o fósforo, siendo registrada la menor fase de latencia en el medio con glifosato como fuente nitrogenada. Se observó un incremento significativo de la fase de latencia en los medios CZN, CZP y CZC respecto al control en el medio CZ; este comportamiento estaría indicando el carácter inductivo del proceso de degradación. Con respecto a la velocidad de crecimiento, todas las cepas mostraron un incremento significativo de este parámetro en el tratamiento con glifosato como fuente de nitrógeno, y en general se observaron valores similares entre los medios CZC, CZP y los controles. Como se mencionó antes, Reddy y col. (2007) observaron valores similares de crecimiento radial en dos cepas de *A. flavus* aisladas de suelos agrícolas en un medio rico adicionado con 5 y 10 mM de glifosato luego de 14 días

de incubación. A pesar de que las formulaciones de los medios son diferentes a las del presente trabajo, los resultados son comparables. Sin embargo en el presente trabajo no se observó inhibición del crecimiento en los distintos medios CZ adicionados con glifosato y la respuesta de las cepas de *Aspergillus* dependió de la vía de utilización del pesticida.

Si bien existe mucha información sobre la capacidad de metabolización de compuestos organofosforados por hongos filamentosos, son escasos los estudios donde se evalúan especies de *Aspergillus*. Hasan (1999b) evaluó la capacidad de *Aspergillus flavus* y *A. sydowii* de utilizar pesticidas organofosforados en condiciones *in vitro* y en suelo. Este autor informó que el número de colonias aisladas de *A. flavus* aumentó con el agregado de 0,5 mmol/L de glifosato (formulado comercial Lancer) utilizado como única fuente carbonada. Además se informó que algunas especies fúngicas tales como *A. niger* y *A. flavus* mostraron capacidad de desarrollar en medios suplementados con diferentes pesticidas (entre ellos el glifosato) como fuente de fósforo. Se puso de manifiesto también la producción *in vitro* de enzimas fosfatasas que hidrolizan eficientemente los pesticidas organofosforados sugiriendo que estas especies serían importantes degradadoras de éstos componentes.

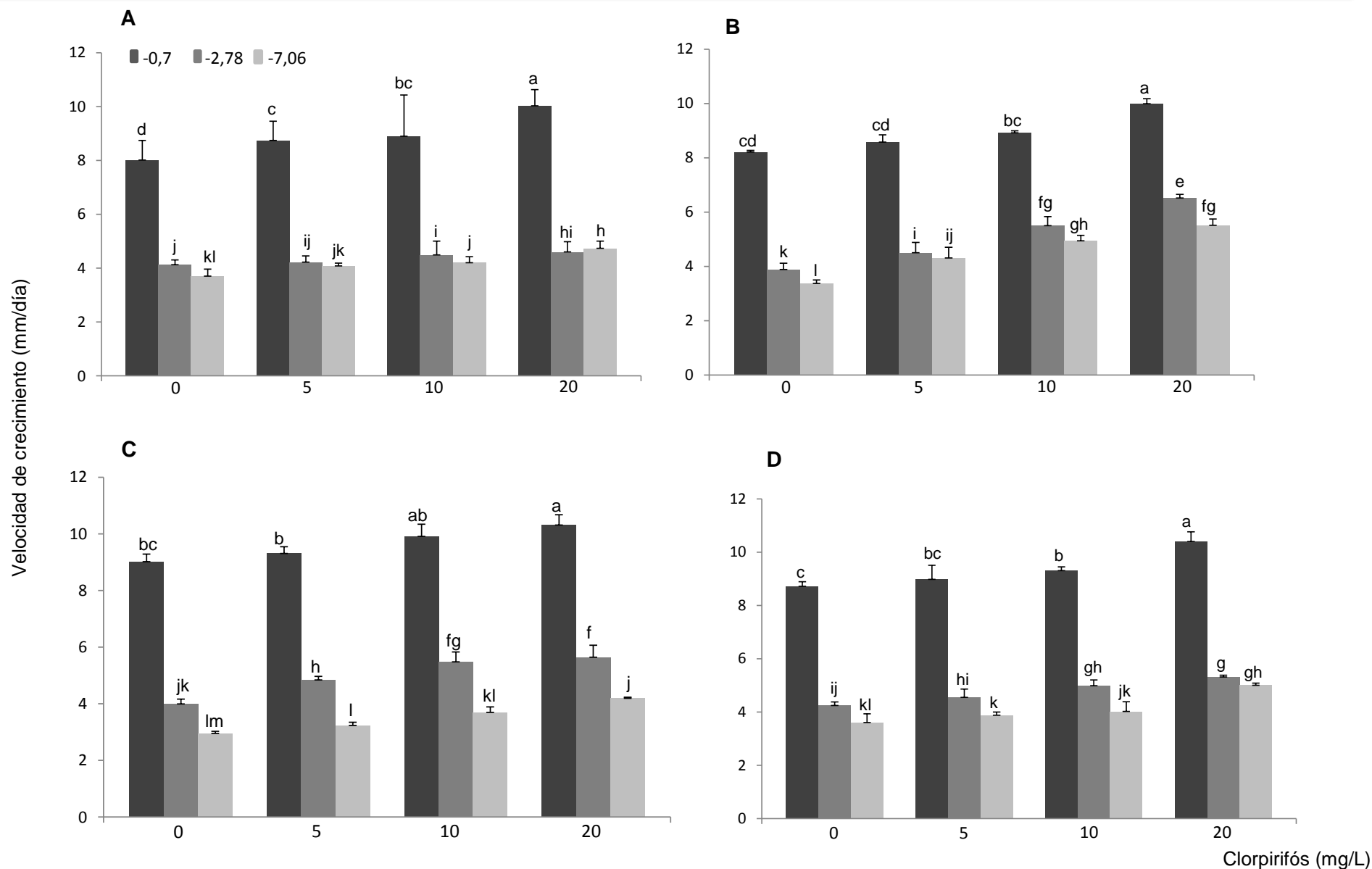
En otro estudio, Krzysko-Lupicka y col. (1997) observaron que tres especies fúngicas diferentes (*Trichoderma harzianum*, *Scopulariopsis* spp. y *A. niger*) desarrollaron en el medio CZ adicionado con 10 mM de glifosato como única fuente de fósforo. Sin embargo, ninguna de las cepas estudiadas desarrolló en el medio CZ adicionado con el herbicida como única fuente de carbono o nitrógeno. Posteriormente, estos autores informaron que todas las cepas de *Fusarium* ensayadas tenían la capacidad de utilizar glifosato como fuente de fósforo, pero no desarrollaron en el medio con el herbicida como fuente de carbono (Krzysko-Lupicka y Sudol 2008). En presencia del herbicida (como única fuente de fósforo) utilizado en concentraciones similares al del presente estudio (1,0 y 1,5 mM) estos autores observaron un incremento muy significativo en el peso seco del micelio. Sólo una de las cepas evaluadas mostró capacidad de utilizar el glifosato (en dosis de 1,0 y 1,5 mM) como única fuente de nitrógeno. Arfarita y col. (2014), observaron que cepas de los géneros, *Scopulariopsis* spp. y *Verticillium* spp., mostraban un patrón de crecimiento similar al comparar el medio CZ completo, con el medio CZ sin la fuente de fósforo y CZ con la adición de glifosato como reemplazo de la fuente inorgánica de fósforo; siendo observado en este último un crecimiento importante. Este comportamiento de las cepas mencionadas anteriormente no coincide con lo observado en el presente trabajo debido a que las cepas de *A. flavus* estudiadas mostraron capacidad para utilizar al glifosato (si bien con parámetros de crecimiento muy variables) tanto como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno.

Existe escasa información acerca del efecto del glifosato en la morfología de las colonias de las especies fúngicas. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el glifosato influye sobre las características macroscópicas de *A. sección Flavi* siendo más marcado el cambio en el medio suplementado con glifosato como fuente de nitrógeno. El desarrollo conidial y micelial de las colonias es muy variable según se adicione en el medio de cultivo como fuente carbonada, de fósforo o nitrógeno. Krzysko-Lupicka y Sudol (2008) observaron cambios macro y microscópicos en la morfología de los conidios (deformaciones) y el micelio de las cepas de *Fusarium* cuando se incubaron en presencia del herbicida. Además, estos autores pusieron en evidencia que estos cambios fenotípicos no eran persistentes, ya que cuando se inocularon las cepas ensayadas en medios completos todas las cepas crecieron con las mismas características que en los controles necesitando un período de adaptación de 24-48 horas.

### **II.V.1.2- Ensayos de tolerancia a clorpirifós**

#### **II.V.1.2.1- En medio AES**

Cuando se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento de cuatro cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi* (AM1, AM2, GM3 y GM4), se observó que en los tratamientos controles a medida que disminuyó la MPa del medio, la velocidad de crecimiento radial de todas las cepas fúngicas se redujo notablemente. Al menor valor de MPa ensayado (-10) no se observó desarrollo en ninguno de los tratamientos en todo el período de incubación (dato no mostrado). En los tratamientos con clorpirifós, se observó que a medida que aumentó la concentración del insecticida también la velocidad de crecimiento de todas las cepas fue aumentando significativamente ( $p < 0,0001$ ). Como particularidad, se evidenció un incremento del 67% en este parámetro de crecimiento con respecto al control en las cepas AM2 y GM3 con 20 mg/L de insecticida a -2,8 de MPa. Mientras que para la cepa GM4 se observó un aumento significativo de la velocidad de crecimiento a partir de 5 mg/L en todos los MPa evaluados ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 17**).



**Figura 17:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial de *A. sección Flavi*: cepa AM1 (A); AM2 (B); GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AES bajo distintos valores de MPa. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD.

Con respecto a la fase de latencia, en concordancia con lo observado para la velocidad de crecimiento, todas las cepas ensayadas mostraron un comportamiento similar (**Tabla 11**). En los tratamientos controles se registraron fases de latencias significativamente más largas al menor valor de MPa (-7,06), mientras que en los otros dos potenciales hídricos (-0,7 y -2,8) los valores resultaron similares. Al menor valor de MPa ensayado (-10) la fase de latencia superó el tiempo de incubación del experimento (dato no mostrado). Con el agregado del insecticida en concentraciones crecientes (de 5 a 20 mg/L), en general, se observaron fases de latencia de menor duración en las cuatro cepas y en todas las condiciones ensayadas. A -7,06 de potencial hídrico, este parámetro disminuyó significativamente a partir del agregado de 5 mg/L en todas las cepas. Mientras que a -0,7 de MPa para las cepas GM3 y GM4 no se observó una disminución significativa de la fase de latencia con 10 y 20 mg/L de insecticida. Lo mismo fue registrado para las cepas AM1 y AM2 pero con la adición de 5 y 10 mg/L de clorpirifós ( $p < 0,0001$ ).

**Tabla 11:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la fase de latencia (hs) de A. sección Flavi (AM1; AM2; GM3; GM4) en el medio AES bajo diferentes condiciones de MPa y a 25°C.

Cepas	MPa	Fase de latencia (hs) $\pm$ DE			
		Clorpirifós (mg/L)			
		0	5	10	20
AM1	-0,70	14,0 $\pm$ 1,1ef	15,0 $\pm$ 0,6e	15,0 $\pm$ 0,6e	12,0 $\pm$ 0,6g
	-2,78	12,0 $\pm$ 0,6gh	13,0 $\pm$ 0,6f	9,0 $\pm$ 0,6ij	9,0 $\pm$ 0,6ij
	-7,06	21,0 $\pm$ 3,0a	18,0 $\pm$ 0,6c	16,0 $\pm$ 0,6de	14,0 $\pm$ 0,6ef
AM2	-0,70	16,0 $\pm$ 1,1cd	13,0 $\pm$ 0,6f	13,0 $\pm$ 0,6f	10,0 $\pm$ 0,6i
	-2,78	14,0 $\pm$ 0,6f	10,0 $\pm$ 1,0hi	11,0 $\pm$ 2,5h	9,0 $\pm$ 1,1ij
	-7,06	21,0 $\pm$ 0,6ab	19,0 $\pm$ 1,0b	16,0 $\pm$ 1,0d	15,0 $\pm$ 1,5ef
GM3	-0,70	15,0 $\pm$ 1,1ef	11,0 $\pm$ 0,6h	10,0 $\pm$ 0,6i	10,0 $\pm$ 0,6i
	-2,78	13,0 $\pm$ 0,6f	10,0 $\pm$ 1,1i	9,0 $\pm$ 0,0j	9,0 $\pm$ 0,6ij
	-7,06	19,0 $\pm$ 1,1bc	16,0 $\pm$ 1,0d	15,0 $\pm$ 0,6ef	13,0 $\pm$ 1,0fg
GM4	-0,70	13,0 $\pm$ 0,0fg	12,0 $\pm$ 0,6gh	12,0 $\pm$ 1,1gh	10,0 $\pm$ 0,6hi
	-2,78	13,0 $\pm$ 1,0fg	11,0 $\pm$ 2,0hi	12,0 $\pm$ 0,6gh	9,0 $\pm$ 0,6ij
	-7,06	22,0 $\pm$ 2,5a	19,0 $\pm$ 0,0b	15,0 $\pm$ 0,6e	14,0 $\pm$ 0,6f

Los valores medios con letras diferentes son estadísticamente significativos según el Test de LSD ( $p < 0,0001$ ).

DE: desvío estándar

Los análisis estadísticos mostraron que los factores concentración de insecticida y MPa por sí solos y la interacción entre el factor cepas y MPa influyen significativamente sobre la velocidad de crecimiento. Mientras que cada uno de los factores analizados por sí solos y la interacción entre cepas y MPa influyeron significativamente sobre la fase de latencia (**Tabla 12**).



**Tabla 12:** Análisis de la varianza del efecto del potencial hídrico (MPa), concentración de clorpirifós (C), diferentes cepas (I) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. sección Flavi* sobre un medio agar extracto de suelo.

Fuente de variación	df <sup>†</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
		MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>	MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
I	3	0,86	6,01	20,80	18,37*
C	3	15,34	107,02*	154,35	136,36*
MPa	2	368,47	2570,10*	487,52	430,69*
I x C	9	0,42	2,95	3,23	2,86
I x MPa	6	2,01	14,02*	6,90	6,10*
I x C x MPa	18	0,19	1,33	3,37	2,97

<sup>†</sup> Grados de libertad.

<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

<sup>§</sup> F-Snedecor.

\* Significancia  $p < 0,0001$ .

#### II.V.1.2.2. En medio base de sustrato

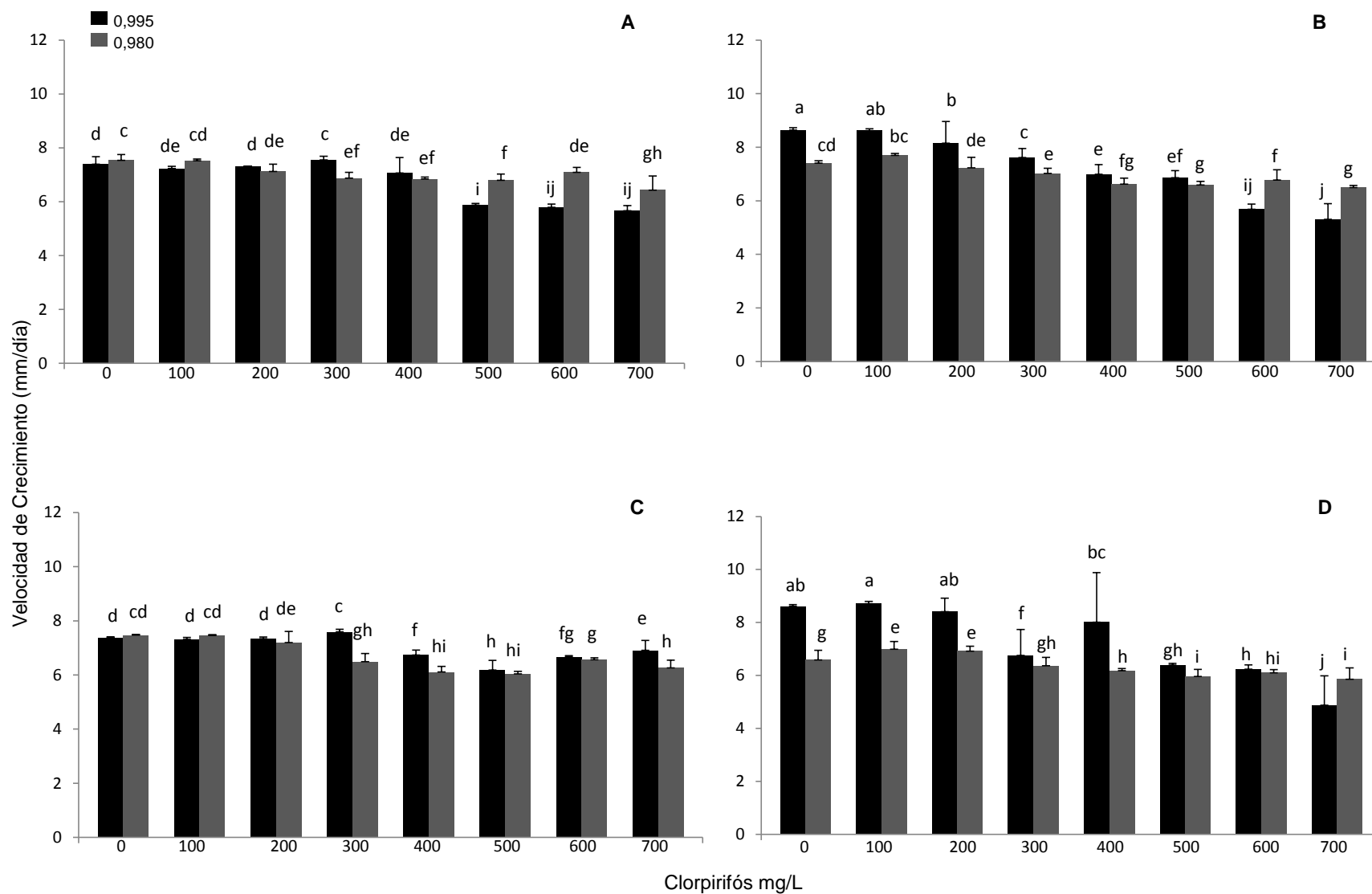
En la **figura 18** se muestra el efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós en la velocidad de crecimiento radial de las cuatro cepas de *A. sección Flavi* en el medio de cultivo AESO bajo distintas condiciones de  $a_w$ . En los tratamientos controles, a diferencia del ensayo en el medio AES, se observó que la velocidad de crecimiento fue menor a la  $a_w$  más baja sólo en las cepas AM2 y GM4. Con respecto a los tratamientos con clorpirifós, en general, este parámetro de crecimiento fue mayor a 0,995 que a 0,980 de  $a_w$  en todas las cepas. Las cuatro cepas fueron capaces de desarrollar con la más alta concentración de insecticida ensayada (700 mg/L). Particularmente, con altas concentraciones de clorpirifós (600 y 700 mg/L), se observaron velocidades de crecimiento mayores a 0,980 de  $a_w$  que a 0,995 en las cepas AM1, AM2 y GM4 ( $p < 0,001$ ).

A 0,995 de  $a_w$ , este parámetro permaneció constante con las concentraciones más bajas (100 y 200 mg/L) de clorpirifós ensayadas. Por el contrario, con las concentraciones más elevadas de insecticida se registraron valores de velocidad menores con respecto al

tratamiento control. Se observó una excepción en la cepa GM3 con 300 mg/L de clorpirifós ya que la velocidad de crecimiento fue significativamente mayor que el respectivo control. A 0,980 de  $a_w$  se observó que la velocidad de crecimiento disminuyó a medida que la concentración de insecticida fue aumentando, excepto en la cepa GM4. Las mayores velocidades de crecimiento para esta cepa se registraron en los tratamientos con 100 y 200 mg/L de clorpirifós; mientras que, a partir de 400 mg/L, la velocidad de crecimiento fue similar y significativamente menor que en el control ( $p < 0,0001$ ). Las reducciones en este parámetro de crecimiento no fueron elevadas ya que ninguna de las concentraciones de pesticida ensayadas alcanzó a reducir en un 50% el crecimiento fúngico (DL 50) con respecto al control.

Con respecto a la fase de latencia, se observaron valores más altos a 0,980 que a 0,995 de  $a_w$  en los tratamientos controles (**Tabla 13**). En general, este comportamiento también fue observado en los tratamientos con clorpirifós. En todas las cepas y condiciones evaluadas, se registraron incrementos significativos de la fase de latencia a medida que la concentración de insecticida fue aumentando. A 0,995 de  $a_w$ , la duración de la fase de latencia de la cepa GM3 fue mayor que la de las demás cepas ensayadas en todo el experimento. El incremento más notable fue observado con 700 mg/L de clorpirifós (78%) ( $p < 0,0001$ ). Como particularidad, a 0,980 de  $a_w$ , la fase de latencia de la cepa AM1 con 100 mg/L del insecticida fue significativamente más corta que la registrada en el control. Además se observó un incremento del 28% en este parámetro para la cepa AM2 en los tratamientos con 500 y 600 mg/L de clorpirifós.

El análisis estadístico de los datos mostró que dos de los factores analizados por sí solos (concentración de insecticida y  $a_w$ ), junto con todas las interacciones entre los tres factores (concentración,  $a_w$  y cepas) influyeron significativamente en la velocidad de crecimiento. Mientras que con respecto a la fase de latencia, cada uno de los factores analizados por sí solos y la interacción entre ellos fueron estadísticamente significativos (**Tabla 14**).



**Figura 18:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial de *A. sección Flavi*: cepa AM1 (A); AM2 (B); GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AESO bajo distintas condiciones de  $a_w$ . Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD.

**Tabla 13:** Efectos de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la fase de latencia (hs) de *A. sección Flavi* (AM1; AM2; GM3 y GM4) en el medio AESO bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y a 25 °C.

		Fase de latencia (hs) $\pm$ DE							
Cepa	$a_w$	Clorpirifós (mg/L)							
		0	100	200	300	400	500	600	700
AM1	0,99	32,0 $\pm$ 2,7ij	33,1 $\pm$ 2,6ij	33,9 $\pm$ 3,7hi	42,6 $\pm$ 2,6ef	43,7 $\pm$ 0,6de	43,1 $\pm$ 2,0e	44,8 $\pm$ 1,5d	45,3 $\pm$ 4,8d
	0,98	37,6 $\pm$ 1,8g	35,0 $\pm$ 2,8hi	37,0 $\pm$ 1,0gh	43,4 $\pm$ 1,4e	46,7 $\pm$ 2,5c	46,3 $\pm$ 3,0cd	44,8 $\pm$ 1,2d	47,5 $\pm$ 2,4bc
AM2	0,99	31,7 $\pm$ 0,7j	32,4 $\pm$ 2,0ij	35,3 $\pm$ 1,0h	33,5 $\pm$ 1,6i	39,0 $\pm$ 2,2fg	44 $\pm$ 2,8de	41,9 $\pm$ 0,4f	41,3 $\pm$ 0,2f
	0,98	33,8 $\pm$ 1,5i	37,9 $\pm$ 0,7g	38,5 $\pm$ 3,4g	41,4 $\pm$ 0,3f	44,1 $\pm$ 1,2de	43,4 $\pm$ 0,3e	43,3 $\pm$ 1,7e	45,9 $\pm$ 0,7cd
GM3	0,99	30,0 $\pm$ 0,7j	33,7 $\pm$ 1,9i	39,1 $\pm$ 0,3fg	42,5 $\pm$ 1,8ef	43,7 $\pm$ 0,6de	42,9 $\pm$ 0,4e	50,4 $\pm$ 1,3ab	53,4 $\pm$ 2,4a
	0,98	35,3 $\pm$ 1,3h	35,5 $\pm$ 1,6h	42,6 $\pm$ 1,2ef	43,9 $\pm$ 0,7de	43,0 $\pm$ 0,7e	44,9 $\pm$ 1,2d	43,1 $\pm$ 3,9e	45,7 $\pm$ 0,4cd
GM4	0,99	35,1 $\pm$ 1,2hi	37,4 $\pm$ 0,8g	35,9 $\pm$ 2,0h	41,4 $\pm$ 0,9f	48,8 $\pm$ 4,0b	45,8 $\pm$ 0,8cd	47,3 $\pm$ 1,4c	44,0 $\pm$ 3,5de
	0,98	37,8 $\pm$ 2,0g	37,0 $\pm$ 2,9gh	40,4 $\pm$ 1,1fg	42,3 $\pm$ 2,2ef	45,2 $\pm$ 1,9d	44,8 $\pm$ 1,2d	46,8 $\pm$ 1,5c	48,4 $\pm$ 3,8bc

Los valores medios con letras diferentes son estadísticamente significativos según el test LSD ( $p < 0,0001$ ).

DE: desvío estándar.

**Tabla 14:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C), diferentes cepas (I) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. sección Flavi* sobre agar extracto de soja.

Fuente de variación	df <sup>†</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
		MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>	MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
I	3	0,83	5,53	92,63	23,97*
C	7	10,13	67,42*	548,01	141,80*
$a_w$	1	4,07	27,07*	136,87	35,42*
I x C	21	0,61	4,03*	15,86	4,10*
I x $a_w$	3	2,02	18,25*	34,96	9,05*
I x C x $a_w$	21	0,62	4,11*	14,11	3,65*

<sup>†</sup> Grados de libertad.

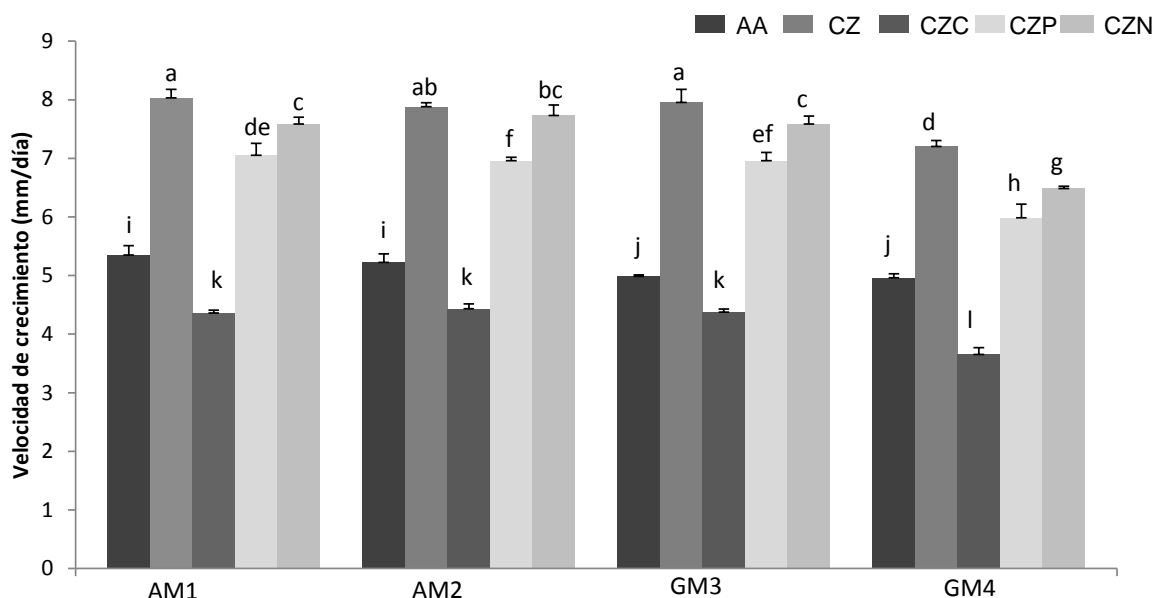
<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

<sup>§</sup> F-Snedecor.

\* Significancia  $p < 0,0001$ .

#### II.V.1.2.3- Evaluación de la capacidad de utilizar clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno

Al analizar los resultados obtenidos con respecto a la velocidad de crecimiento, se observó que todas las cepas ensayadas mostraron un comportamiento similar entre ellas en los distintos medios analizados. Los valores más elevados en la velocidad de crecimiento se registraron en el medio CZ completo mientras que los valores más bajos fueron observados en el medio de cultivo donde el insecticida reemplazó la fuente carbonada (CZC) ( $p < 0,001$ ). Con respecto a los medios de cultivos suplementados con el insecticida, se observó que este parámetro de crecimiento fue significativamente mayor en el medio CZN que en el medio CZP para todas las cepas ensayadas (**Figura 19**).



**Figura 19:** Efecto del agregado de clorpirifós al medio CZ como fuente de carbono (CZC), fósforo (CZP) y nitrógeno (CZN) sobre la velocidad de crecimiento de cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi*. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) de acuerdo al test LSD. AA: agar agua

En concordancia con los resultados anteriores, los resultados obtenidos con respecto a la fase de latencia de las cuatro cepas en estudio también evidenciaron un comportamiento similar. Las fases de latencia más largas fueron registradas en el medio CZC, y en general, no se observaron diferencias significativas en este parámetro entre el medio donde el clorpirifós reemplazó la fuente de fósforo (CZP) con respecto al CZ control; a excepción de la cepa GM4, donde se observaron diferencias entre estos dos medios ( $p < 0,0001$ ). Con respecto al tratamiento control en el medio AA, las fases de latencia de todas las cepas en el medio CZP fueron significativamente más cortas que en el respectivo control. Por el contrario, la duración de las fases de latencia en el medio CZN fue significativamente mayor que la observada en el medio CZ completo y no se observaron diferencias significativas entre los valores de fase de latencia registrados en el medio CZN con respecto al medio AA (Tabla 15).

**Tabla 15:** Fase de latencia (hs) de cepas no toxicogénicas de *A. sección Flavi* en medios de cultivo adicionados con clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno y medios controles.

Cepa	Fase de latencia (hs) $\pm$ DE				
	AA	CZ	CZC	CZP	CZN
<b>AM1</b>	31,6 $\pm$ 1,8de	28,5 $\pm$ 0,7fg	39,4 $\pm$ 2,7a	27,6 $\pm$ 0,6gh	33,7 $\pm$ 1,0cd
<b>AM2</b>	30,7 $\pm$ 1,2ef	25,1 $\pm$ 1,4h	35,0 $\pm$ 2,6bc	25,3 $\pm$ 1,1h	31,3 $\pm$ 0,5de
<b>GM3</b>	32,1 $\pm$ 0,9de	30,3 $\pm$ 2,6fg	33,7 $\pm$ 0,9cd	25,7 $\pm$ 1,5h	31,6 $\pm$ 0,4de
<b>GM4</b>	31,7 $\pm$ 0,8de	29,7 $\pm$ 1,0fg	36,0 $\pm$ 1,1bc	18,8 $\pm$ 1,8i	36,9 $\pm$ 3,8ab

Los valores medios con letras diferentes son estadísticamente significativos según el Test de LSD ( $p < 0,0001$ ).

AA: agar agua

CZ: Czapeck completo

CZC: Czapeck con clorpirifós como fuente de carbono

CZP: Czapeck con clorpirifós como fuente de fósforo

CZN: Czapeck con clorpirifós como fuente de nitrógeno

DE: desvío estándar

Cada uno de los factores analizados, por sí solos y sus interacciones influenció significativamente en la velocidad de crecimiento de las cepas ensayadas. En cambio el medio de cultivo y su interacción con las cepas fueron estadísticamente significativos con respecto a la fase de latencia (**Tabla 16**).

**Tabla 16:** Análisis de la varianza del efecto de los medios de cultivo (M) y diferentes cepas (I), y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. sección Flavi* en diferentes medios adicionados con clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno.

Fuente de variación	df <sup>†</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
		MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>	MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
M	4	27,38	1570,27*	246,66	88,13*
I	3	2,21	126,55*	17,80	6,36
M x I	12	0,12	6,66*	20,28	7,25*

<sup>†</sup> Grados de libertad.

<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

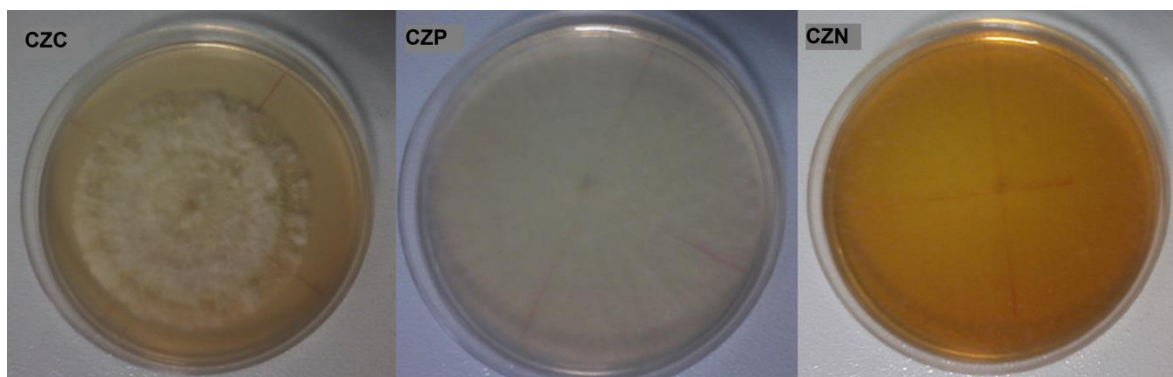
<sup>§</sup> F-Snedecor.

\* Significancia  $p < 0,001$

#### II.V.1.2.3.1- Características macroscópicas de las colonias en los medios suplementados con clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno

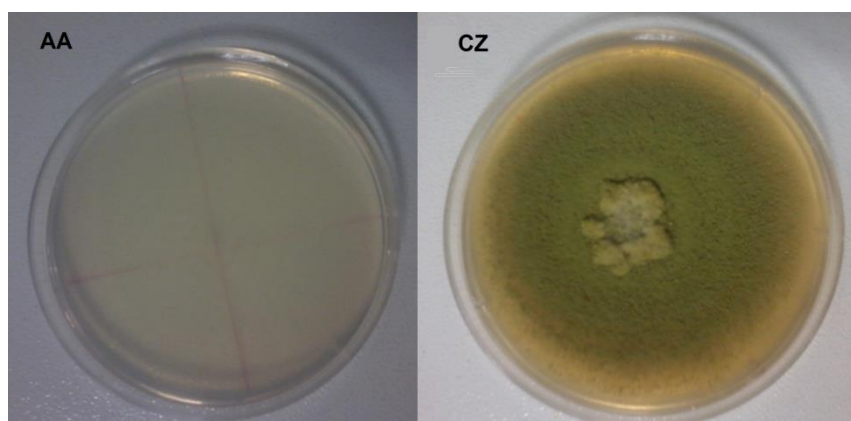
Se observaron cambios macroscópicos en las colonias desarrolladas en los distintos medios ensayados. Las colonias en el medio CZC eran algodonosas con abundante micelio blanco y escasa esporulación. Por el contrario, se observaron colonias planas, difusas y sin esporulación cuando el clorpirifós reemplazó la fuente de fósforo. En el medio CZN la morfología de las colonias resultó similar a la observada en el medio CZP, siendo las colonias aún más difusas y sin esporulación (**Figura 20**).





**Figura 20:** Características morfológicas de las colonias de *A. oryzae* AM2 desarrolladas en el medio CZ con el agregado de clorpirifós como fuente de carbono (CZC), fósforo (CZP) y nitrógeno (CZN).

En la **figura 21** se muestran placas con las características morfológicas típicas de las colonias de *A. oryzae* AM2 desarrolladas en el medio CZ completo y en AA. Las colonia en el medio CZ completo posee las características típicas de una cepa de *Aspergillus* de la sección *Flavi*: colonia velutinosa, algodonosa en el centro, abundante esporulación color verde-oliva y escaso micelio blanco en los márgenes. Mientras que en el medio agar-agua la colonias es plana con abundante micelio blanco y escasa esporulación, es decir, similares a las observadas en el medio CZN.



**Figura 21:** Características morfológicas de las colonias de *A. oryzae* AM2 desarrolladas en el medio agar Czapeck (CZ) y en agar agua (AA).

Mediante los ensayos de crecimiento *in vitro* se logró evaluar el efecto del insecticida clorpirifós aplicado en concentraciones crecientes, sobre la velocidad de crecimiento radial y la fase de latencia de cuatro cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi*, evaluándose también el efecto producido por diferentes condiciones de disponibilidad de

agua sobre los parámetros de crecimiento ya mencionados. En los tratamientos controles (sin el agregado de clorpirifós) se observó que a medida que disminuyó el MPa del medio, la velocidad de crecimiento radial de todas las cepas fúngicas se redujo notablemente sólo en el medio AES. Mientras que en el ensayo en el medio AESO se observó que la velocidad de crecimiento fue menor a la  $a_w$  más baja sólo en las cepas AM2 y GM4. Con respecto a los tratamientos con clorpirifós, en general, este parámetro de crecimiento fue mayor a 0,995 que a 0,980 de  $a_w$  en todas las cepas. En el medio AES, se observó que a medida que aumentó la concentración del insecticida también la velocidad de crecimiento de todas las cepas aumentó significativamente. Con las mayores concentraciones ensayadas en el medio AESO se observaron reducciones significativas en la velocidad de crecimiento en comparación a los controles. Sin embargo, ninguna de las concentraciones evaluadas logró reducir en un 50% el crecimiento fúngico con respecto al control. Estos resultados difieren de los resultados observados con respecto al herbicida glifosato, ya que en el medio AES las velocidades de crecimiento permanecieron constantes con el sucesivo incremento de glifosato. Sólo en algunos casos se evidenció un incremento en este parámetro a medida que el herbicida aumentaba. Además, con respecto al ensayo en el medio AESO, las elevadas concentraciones de glifosato ensayadas (desde 200 a 500 mM) sí lograron reducir la velocidad de crecimiento radial en más del 50% en algunos casos; mientras que esto no fue observado con clorpirifós. Estos resultados nos muestran que las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* ensayadas si bien son tolerantes a ambos pesticidas, es evidente que existe una mayor tolerancia a clorpirifós y que dicha tolerancia se ve afectada según la cepa desarrolle en un medio pobre o rico en nutrientes. Es evidente que este último medio favorece la tolerancia a ambos pesticidas, aun bajo condiciones desfavorables de disponibilidad de agua.

Con respecto a la fase de latencia previa al crecimiento, en concordancia con lo observado para la velocidad de crecimiento en el medio AES, en los tratamientos controles se registraron fases de latencias significativamente más largas al menor MPa (-7,06), mientras que en los otros dos potenciales hídricos (-0,7 y -2,8) los valores resultaron similares. Con el agregado del insecticida en concentraciones crecientes, en general, se observaron fases de latencia de menor duración en las cuatro cepas y en todas las condiciones ensayadas. Por el contrario, en el ensayo realizado en el medio AESO se observaron valores más altos a 0,980 que a 0,995 de  $a_w$  en los tratamientos controles. En general, este comportamiento también fue observado en los tratamientos con clorpirifós. En todas las cepas y condiciones evaluadas, se registraron incrementos significativos de la fase

de latencia a medida que la concentración de insecticida fue aumentando. Comparando nuevamente con los resultados obtenidos con glifosato, se observaron diferencias en cuanto al efecto de las concentraciones crecientes del pesticida sobre la fase de latencia de las cepas en estudio. Con glifosato en el medio AES, en general la fase de latencia se mantuvo relativamente constante a medida que la concentración del herbicida fue aumentando; mientras que, con clorpirifós, los valores registrados fueron menores a medida que aumentó la concentración de insecticida en el medio. Los resultados obtenidos del ensayo en el medio AESO con ambos pesticidas resultaron similares, ya que en ambos experimentos a medida que aumentó la concentración de pesticida la fase de latencia también lo hizo.

Los hongos han sido utilizados exitosamente para remover una gran variedad de compuestos xenobióticos (Singh 2008). El crecimiento micelial y las enzimas degradativas de naturaleza extracelular, les provee a estos microorganismos una ventaja competitiva sobre otros, tales como bacterias y levaduras. Varios autores han informado microorganismos, tanto bacterias como hongos, con capacidad potencial para degradar clorpirifós (Maya y col. 2012; Chishti y col. 2013; Dhanya 2014). Sin embargo, es escasa la información sobre la tolerancia o la capacidad de degradación de clorpirifós por cepas fúngicas, más aún por cepas del género *Aspergillus* (Omar 1998; Karas y col. 2011; Maya y col. 2012; Silambarasan y Abraham 2013; Hindumathy y Gayathri 2013; Carranza y col. 2014b). Omar (1998) observó que una cepa de *Aspergillus terreus* presentaba la mayor capacidad potencial de mineralizar el fósforo orgánico y el azufre del clorpirifós seguido por cepas de *A. tamarii* y *A. niger*, entre otras especies fúngicas. Karas y col. (2011) estudiaron la degradación de varios pesticidas (entre ellos clorpirifós) por tres cepas de hongos de la podredumbre blanca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*) y una cepa de *A. niger* en dos medios de cultivos diferentes, entre ellos caldo extracto de suelo. Todas las cepas fueron capaces de degradar el insecticida en el medio a base de suelo, observándose una rápida disminución del mismo en el medio de cultivo dentro de los dos primeros días de incubación.

En un estudio realizado por Hindumathy y Gayathri (2013), se evaluó la degradación de clorpirifós (100 ppm) en un medio de cultivo sintético mineral tanto por bacterias como por hongos (especies del género *Aspergillus*) con o sin el agregado de una fuente carbonada. Estos investigadores observaron que tanto las cepas bacterianas como las fúngicas fueron capaces de degradar el insecticida en altos porcentajes con o sin la fuente de carbono (84,5 y 73,3% para las bacterias o 73,3 y 58% para los hongos, respectivamente).

Los resultados del presente trabajo coinciden parcialmente con los informados por Silambarasan y Abraham (2013) ya que estos autores observaron que una cepa de *A. terreus* aislada de suelo agrícola fue capaz de tolerar concentraciones de hasta 400 mg/L del insecticida en un medio sintético mineral. Mientras que las concentraciones ensayadas en el presente trabajo llegaron hasta 700 mg/L en el medio de cultivo AESO y no se logró evidenciar una reducción en el crecimiento fúngico mayor al 50% en ninguna de las cepas ensayadas. Los autores antes mencionados observaron un visible incremento en el peso seco micelial al incubar dicha cepa de *A. terreus* en el medio de cultivo adicionado con 300 mg/L de clorpirifós como única fuente de carbono. Estos resultados son similares a los observados en el ensayo en el medio sólido AES donde se evidenciaron velocidades de crecimiento mayores a medida que se incrementó la concentración de insecticida, siendo las concentraciones ensayadas menores a la informada en ese trabajo (hasta 20 mg/L). En otro trabajo, Maya y col. (2012) aislaron e identificaron cepas fúngicas de suelos con exposición prolongada a clorpirifós para estudiar la degradación de este insecticida y su principal metabolito de degradación 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) por consorcios fúngicos en medio de cultivo sintético. Los principales géneros aislados fueron *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Eurotium* spp., y *Emericella* spp. Estos autores observaron que las cepas de *Aspergillus* spp. fueron las que, luego de incubarlas con concentraciones crecientes de clorpirifós (50, 85, 100 y 150 mg/L), produjeron una mayor biomasa fúngica y lograron degradar más rápidamente tanto el insecticida como el TCP en concentraciones de hasta 200 mg/L para ambos compuestos. Aunque en el presente trabajo no se evaluó aún la degradación del pesticida, los resultados de crecimiento obtenidos de los ensayos *in vitro* en donde se adicionaron concentraciones mucho más elevadas de clorpirifós, parecen promisorios para los posteriores estudios de biodegradación ya que la tolerancia a clorpirifós que presentan las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* estudiadas resultó ser elevada (más de 700 mg/L).

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de trabajo se evaluó la tolerancia a tres pesticidas (entre ellos clorpirifós) de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* en medio de cultivo a base de suelo (Carranza y col. 2014b). Los resultados obtenidos con *A.* sección *Flavi* no coinciden con lo informado en ese trabajo previo ya que, con respecto a la velocidad de crecimiento, en general se observaron disminuciones significativas a medida que aumentó la concentración de clorpirifós mientras que con las cepas de la sección *Flavi* se evidenció un aumento significativo en la velocidad de crecimiento con las mismas concentraciones de insecticida y condiciones de incubación. En concordancia con lo anterior, las fases de latencia de las cepas de la sección *Nigri* fueron aumentando a medida que se incrementó la

concentración de insecticida a -2,78 y -7,06 MPa lo cual representa otra diferencia al comparar lo observado para las cepas de la sección *Flavi* ensayadas en el presente trabajo.

En cuanto a los ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de las cepas para utilizar clorpirifós como fuente de carbono, fósforo y/o nitrógeno, los resultados muestran que las cuatro cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* son capaces de desarrollar en un medio sintético adicionado con el insecticida como única fuente de carbono, fósforo y/o nitrógeno evidenciando un comportamiento similar entre las cepas en estudio. Los mayores valores de velocidad de crecimiento se registraron en el medio CZ completo mientras que los valores más bajos fueron observados en el medio de cultivo donde el insecticida reemplazó la fuente carbonada (CZC). Con respecto a los otros medios modificados, se observó que este parámetro de crecimiento fue significativamente mayor en el medio CZN que en el medio CZP para todas las cepas ensayadas. En concordancia con los resultados anteriores, las fases de latencia más largas fueron registradas en el medio CZC, y en general, no se observaron diferencias significativas en este parámetro cuando el clorpirifós reemplazó la fuente de fósforo del medio de cultivo con respecto al control en el medio CZ completo. Con respecto al tratamiento control en el medio agar agua (AA), las fases de latencia de todas las cepas en el medio CZP fueron significativamente más cortas que en el respectivo control. Por el contrario, la duración de las fases de latencia en el medio CZN fue significativamente más larga que la observada en el medio CZ completo y no se observaron diferencias significativas entre los valores de fase de latencia registrados en el medio CZN con respecto al medio AA.

Con glifosato las cepas ensayadas también fueron capaces de desarrollar en el medio adicionado con el herbicida como única fuente de carbono, fósforo y/o nitrógeno. En cuanto a la velocidad de crecimiento radial de las cepas, los resultados fueron similares para los dos pesticidas ya que este parámetro fue mayor cuando las cepas desarrollaron en el medio donde los pesticidas reemplazaron la fuente de nitrógeno. Sin embargo, con clorpirifós se evidenció que este parámetro de crecimiento fue menor en el medio CZC mientras que con glifosato las menores velocidades de crecimiento fueron registradas en el medio AA y, entre los medios CZC y CZP los valores fueron similares.

En cuanto a la fase de latencia con glifosato, las cepas ensayadas necesitaron un tiempo de adaptación mayor a 29 horas para desarrollar en un medio de cultivo con el herbicida como fuente de carbono, fósforo o nitrógeno; mientras que con clorpirifós este tiempo fue considerablemente menor (18 horas). La duración de este parámetro de crecimiento fue

menor en el medio adicionado con glifosato como fuente nitrogenada; mientras que con clorpirifós esto fue registrado en el medio CZP. Al comparar los medios modificados con glifosato con respecto al control en el medio CZ completo, este parámetro aumentó en los tres medios adicionados con el herbicida. En cambio con clorpirifós, las fases de latencia observadas en el medio CZP fueron similares al respectivo control (CZ).

En la literatura existen varios estudios que informan la tolerancia y degradación de clorpirifós por diferentes especies fúngicas tanto en condiciones *in vitro* como en el suelo, siendo este insecticida adicionado como fuente de carbono o nitrógeno en la mayoría de los trabajos (Chu y col. 2008; Kulshrestha y Kumari 2011; Maya y col. 2012; Gao y col. 2012; Silambarasan y Abraham 2013; Hindumathy y Gayathri 2013). A diferencia de los datos publicados, las cepas de *A. sección Flavi* evaluadas mostraron capacidad no sólo de desarrollar en medios suplementados con clorpirifós como fuente de carbono y nitrógeno, sino también como fuente de fósforo. Contrariamente a lo observado en el presente trabajo, Fang y col. (2008) observaron que una cepa de *Verticillium* spp. fue capaz de desarrollar e incrementar rápidamente su biomasa fúngica con clorpirifós adicionado a un medio de cultivo mineral como única fuente de carbono (100 mg/L) pero luego de 5 días de incubación. Maya y col. (2012) obtuvieron resultados similares en cuanto al peso seco del micelio de distintas cepas fúngicas con el agregado del insecticida (50-150 mg/L) como única fuente carbonada. Silambarasan y Abraham (2013) también observaron un incremento significativo en el peso seco y en la velocidad de crecimiento, al comparar el desarrollo de *A. terreus* en un medio mineral suplementado con 300 mg/L de clorpirifós como fuente carbonada, con el desarrollo registrado en el medio control sin el insecticida. En el estudio realizado por Hindumathy y Gayathri (2013), también evaluaron el crecimiento de cepas de *Aspergillus* spp. en presencia de clorpirifós y en presencia o ausencia de glucosa como fuente carbonada. Estos autores informaron que las cepas mostraron buen desarrollo en el medio de cultivo sin la adición de glucosa y con la presencia del insecticida, confirmando la capacidad de los mismos de utilizar el pesticida como fuente de carbono y energía. Kulshrestha y Kumari (2011) estudiaron la utilización de clorpirifós como fuente de carbono y nitrógeno por cepas fúngicas puras y en co-cultivo. En este trabajo observaron que todos los cultivos fúngicos fueron capaces de degradar el insecticida tanto como fuente de nitrógeno como de carbono, siendo en el primero de los casos dónde se registraron mayores porcentajes de degradación (22,4 a 36,1 y 15,3 a 30,5%; respectivamente).

En la bibliografía son escasos los estudios que investigan el efecto de compuestos organofosforados en caracteres fenotípicos y/o genotípicos en hongos (Krzysko-Lupicka y

Sudol 2008; Silambarasan y Abraham 2013; Nicolas y col. 2016). Los resultados de este trabajo indican que el clorpirifós influye sobre las características macroscópicas de *Aspergillus* sección *Flavi*. El desarrollo conidial y micelial de las colonias es variable según se adicione en el medio de cultivo como fuente carbonada, de fósforo o nitrógeno. Con respecto a los resultados obtenidos con glifosato, se observaron varias diferencias en cuanto a los cambios morfológicos. Con glifosato como fuente carbonada, si bien las colonias tenían abundante micelio blanco, sí se observó una esporulación verde oliva en el centro de la misma mientras que con clorpirifós la esporulación fue imperceptible a la vista. Al comparar lo observado en el medio CZP, las diferencias resultan aún más marcadas. Con glifosato las colonias resultaron velutinosas o ligeramente flocosas con abundante esporulación y escaso micelio blanco y el color de los conidios en este medio fue amarillo-dorado. Por el contrario, se observaron colonias planas y sin esporulación cuando el clorpirifós reemplazó la fuente de fósforo. Por último, las características macroscópicas de las colonias en el medio CZN fueron similares en ambos ensayos ya que las colonias resultaron planas con escasa o nula esporulación. Algunos autores informaron cambios morfológicos en cepas de *Aspergillus* expuestas a clorpirifós. Silambarasan y Abraham (2013) observaron cambios microscópicos en la morfología de las hifas de *A. terreus* cuando se incubaron en presencia del insecticida. La superficie del micelio pasó de ser lisa a volverse rugosa e irregular luego del proceso de degradación del clorpirifós.

La variación morfológica observada en las cepas de *A.* sección *Flavi* en presencia tanto de glifosato como de clorpirifós pone de manifiesto la adaptación de las cepas al medio modificado.

#### **II.V.1.2- Evaluación *in vitro* de la tolerancia a diferentes dosis combinadas de glifosato y clorpirifós por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* no toxicogénicas en medio AESO**

En la **figura 22** se muestra el efecto de las distintas combinaciones de los pesticidas glifosato y clorpirifós en la velocidad de crecimiento de cuatro cepas de *A.* sección *Flavi* en el medio de cultivo AESO en diferentes condiciones de  $a_w$ . En general las cuatro cepas mostraron un comportamiento similar, en el tratamiento control (C0: sin pesticidas) a menor  $a_w$  se observó una mayor velocidad de crecimiento. Mientras que este resultado no se obtuvo con todos los tratamientos ensayados.

Al analizar las distintas combinaciones ensayadas, se observó que este parámetro de crecimiento varió de acuerdo a las concentraciones de pesticidas y a la cepa evaluada. En los tratamientos C1 a C4 se mantuvo constante la concentración de glifosato (100 mM) y la

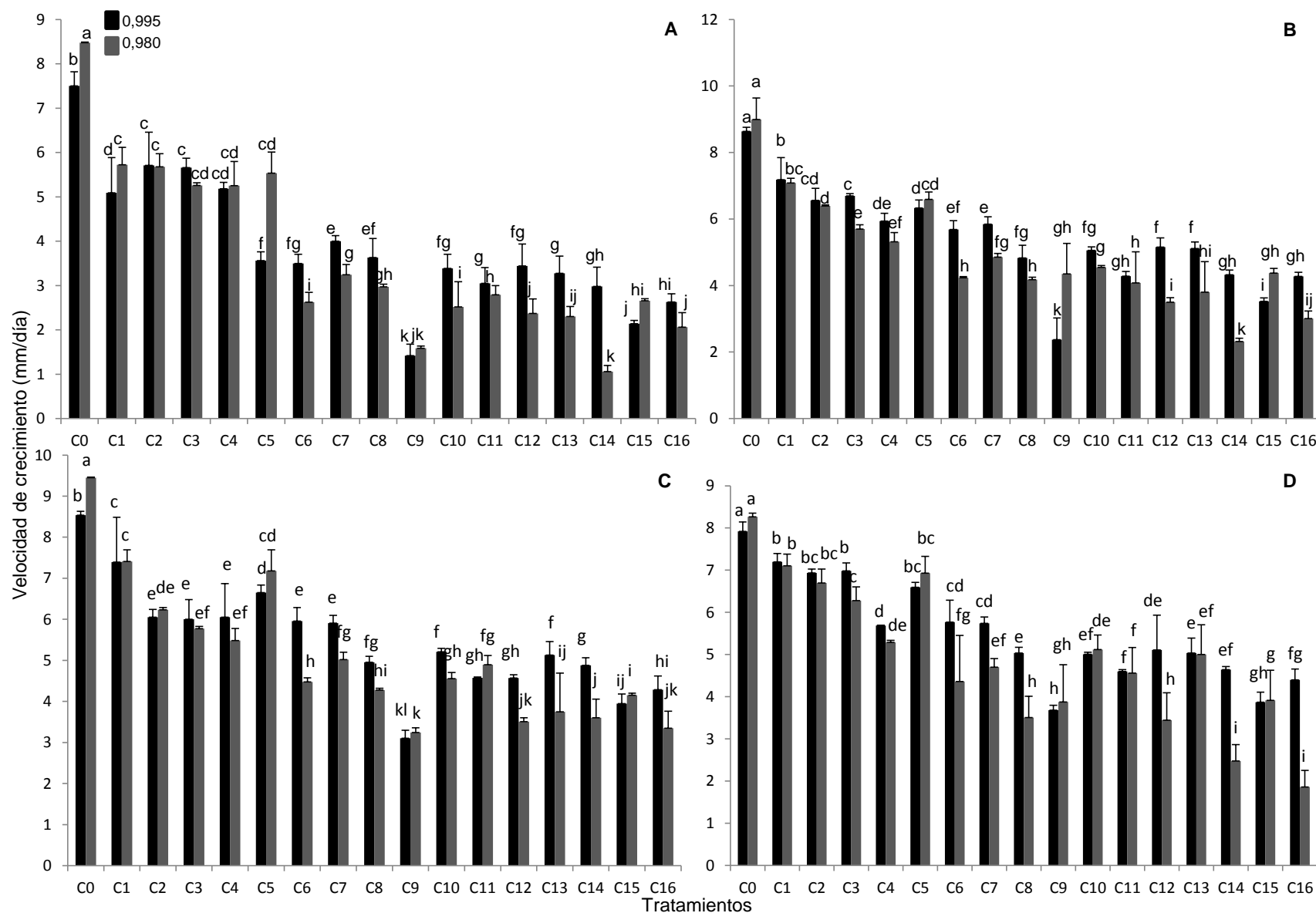
concentración de clorpirifós fue aumentando (de 0,3 a 2 mM, respectivamente). Para las cepas AM1 y GM3, salvo algunas excepciones, la velocidad de crecimiento se mantuvo constante a medida que aumentó la concentración de clorpirifós en ambas condiciones de  $a_w$ . Mientras que, para las cepas AM2 y GM4, este parámetro disminuyó significativamente a medida que el insecticida aumentó ( $p < 0,0001$ ). En el caso de los tratamientos C5 al C8 donde la concentración de glifosato era de 300 mM, la velocidad de crecimiento a 0,995 de  $a_w$  de las cepas AM2 y GM3 disminuyó significativamente mientras la concentración de clorpirifós aumentó. Por el contrario, este parámetro se mantuvo constante para la cepa AM1 y, con respecto a la cepa GM4, sólo se observó una disminución significativa en el tratamiento C8 (2 mM de clorpirifós). A 0,980 de  $a_w$ , a medida que aumentó la concentración del insecticida, la velocidad de crecimiento se mantuvo relativamente constante para las cepas AM1 y GM3; mientras que para las cepas AM2 y GM4, este parámetro disminuyó con concentraciones crecientes de clorpirifós. Con 400 mM de glifosato (tratamientos C9 al C12), se observó la particularidad de que el tratamiento C9 (0,3 mM de clorpirifós) fue el que provocó una disminución más significativa de la velocidad de crecimiento de las cepas AM1, AM2 y GM3. En los demás tratamientos, a 0,995 de  $a_w$ , este parámetro se mantuvo constante para las cepas mencionadas anteriormente; mientras que la velocidad de crecimiento de la cepa GM4 aumentó con el incremento de la concentración de clorpirifós. A 0,980 de  $a_w$ , sólo la cepa AM2 tuvo una velocidad de crecimiento constante; para las demás cepas este parámetro aumentó con 0,8 y 1,4 mM de clorpirifós (tratamiento C10 y C11) y luego disminuyó significativamente con 2 mM de insecticida. A la más alta concentración de glifosato (500 mM), nuevamente los resultados fueron muy variables de acuerdo a la  $a_w$  y a la cepa ensayada. La velocidad de crecimiento de las cepas AM1, AM2 y GM3 disminuyó con el incremento en la concentración de insecticida, mientras que para la cepa GM4 se observó primero una disminución de este parámetro en el tratamiento C14 (0,8 mM de clorpirifós) y luego un aumento significativo en el último tratamiento (2 mM de clorpirifós) a 0,995 de  $a_w$ . A 0,980 sólo para la cepa GM3 se registraron velocidades de crecimiento constantes a medida que aumentó la concentración de insecticida.

Analizando el efecto de los tratamientos en donde la concentración de clorpirifós se mantuvo constante y la concentración de glifosato aumentó, se observó un comportamiento más uniforme para todas las cepas ensayadas a ambas condiciones de  $a_w$ . En general a medida que la concentración de glifosato aumentó, la velocidad de crecimiento disminuyó. Se observaron algunas excepciones donde este parámetro se mantuvo relativamente constante, por ejemplo, la velocidad de crecimiento de la cepa GM3 fue similar en los



tratamientos con 2 mM de clorpirifós: C12 y C16 (400 y 500 mM de glifosato respectivamente) y para la cepa GM4 en los tratamientos C8 y C12 (300 y 400 mM de glifosato).

Los tratamientos que provocaron más del 50% de reducción de la velocidad de crecimiento radial (DL50) variaron según la cepa evaluada. Como particularidad, el tratamiento C9 (400 mM glifosato + 0,3 mM clorpirifós) fue el que redujo en mayor medida el crecimiento de las cepas AM1, AM2 y GM3 con valores de aproximadamente 81, 72 y 63% de reducción a 0,995 de  $a_w$ . En cambio para la cepa GM4 los tratamientos C14 y C16 (500 mM glifosato + 0,8 y 2 mM clorpirifós respectivamente) provocaron los mayores porcentajes de reducción del crecimiento (70 y 77% respectivamente a 0,980 de  $a_w$ ). En general la cepa GM3 fue la que tuvo los menores porcentajes de reducción del crecimiento en todos los tratamientos ensayados.



**Figura 22:** Efecto de las distintas combinaciones de glifosato y clorpirifós en la velocidad de crecimiento (mm/día) de cepas de *A. section Flavi* AM1 (A), AM2 (B), GM3 (C) y GM4 (D) en el medio AESO a 25°C. El análisis estadístico se realizó para cada cepa, los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0.0001$ ) de acuerdo al test LSD.

Con respecto a la fase de latencia, no se observaron diferencias significativas en los valores registrados en el control a las dos  $a_w$  ensayadas (**Tabla 17**). En general, esto también se observó en los primeros tratamientos en todas las cepas (del C1 al C8), mientras que en los demás tratamientos se registraron valores de fase de latencia diferentes de acuerdo a la condición de  $a_w$ . Para todas las cepas, la duración de la fase de latencia se mantuvo similar al tratamiento control hasta el tratamiento C4, es decir que con una concentración constante de glifosato (100 mM) y el sucesivo incremento en la concentración de clorpirifós, este parámetro no se modificó significativamente ( $p < 0,0001$ ). Con 300 mM de glifosato y en ambas condiciones de  $a_w$ , las fases de latencia de las cepas AM1 y AM2 fueron más largas a medida que aumentó la concentración de clorpirifós en el medio de cultivo, salvo algunas excepciones. Lo mismo se registró para la cepa GM3 y GM4 pero a 0,980 de  $a_w$ . Mientras que la duración de este parámetro de crecimiento se mantuvo constante en las cepas GM3 y GM4 a 0,995 de  $a_w$ . En concordancia con lo observado para la velocidad de crecimiento, el tratamiento 9 fue el que produjo un aumento más pronunciado en la fase de latencia, ya que como se observa en la tabla en este tratamiento se obtuvieron los valores más elevados de este parámetro. A una concentración de glifosato de 400 mM y con el progresivo incremento de la concentración de clorpirifós (tratamientos C9 al C12), se observó que la fase de latencia de las cepas AM1 y GM4 a ambas  $a_w$  y de la cepa AM2 a 0,980 se mantuvo constante; mientras que la duración de este parámetro de crecimiento aumentó a medida que la concentración de insecticida incrementó para las cepas AM2 y GM3 a 0,995 y 0,980 respectivamente. Por último, con la máxima concentración de glifosato ensayada (500 mM), sólo se observó un incremento en la fase de latencia de las cepas AM2 y GM4 a 0,980 y 0,995 de  $a_w$  respectivamente.

Al observar los resultados obtenidos con concentraciones constantes de clorpirifós y concentraciones variables de glifosato, nuevamente en concordancia con lo obtenido para el otro parámetro de crecimiento analizado, en general el comportamiento de las cepas ensayadas resultó uniforme a ambas  $a_w$ . La duración de la fase de latencia aumentó a medida que se incrementó la concentración del herbicida en el medio de cultivo.

El análisis estadístico de los datos mostró que los dos factores analizados por sí solos (tratamiento y  $a_w$ ), junto con su interacción influyeron significativamente en la velocidad de crecimiento de las cepas AM1, GM3 y GM4. Para la cepa AM1 sólo el factor tratamiento afectó significativamente este parámetro. Mientras que con respecto a la fase de latencia, cada uno de los factores analizados por sí solos y la interacción entre ellos fueron

estadísticamente significativos para AM1 y AM2. Para las cepas GM3 y GM4, sólo los tratamientos influyeron significativamente sobre la fase de latencia (**Tabla 18**).

**Tabla 17:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato y clorpirifós sobre la fase de latencia (hs) de *A. sección Flavi* (AM1; AM2; GM3 y GM4) en el medio AESO bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y a 25°C.

Tratamientos	$a_w$	Fase de latencia (hs) $\pm$ DE			
		Cepas			
		AM1	AM2	GM3	GM4
C0	0,995	27,0 $\pm$ 1,2kl	25,8 $\pm$ 1,1jk	26,8 $\pm$ 1,9hi	25,7 $\pm$ 0,6g
	0,980	23,5 $\pm$ 0,5kl	21,8 $\pm$ 2,7jk	22,8 $\pm$ 1,0hi	22,9 $\pm$ 1,0g
C1	0,995	33,4 $\pm$ 4,2k	27,0 $\pm$ 3,4jk	33,5 $\pm$ 2,8h	32,1 $\pm$ 3,7fg
	0,980	33,5 $\pm$ 0,8k	29,8 $\pm$ 1,3j	31,0 $\pm$ 1,1hi	29,8 $\pm$ 1,3fg
C2	0,995	37,0 $\pm$ 4,0jk	29,4 $\pm$ 0,3j	34,0 $\pm$ 3,2h	34,9 $\pm$ 1,2fg
	0,980	33,3 $\pm$ 0,6k	29,8 $\pm$ 1,7j	33,8 $\pm$ 0,6h	33,5 $\pm$ 0,7fg
C3	0,995	38,5 $\pm$ 3,1jk	32,7 $\pm$ 3,1j	31,3 $\pm$ 3,5h	38,5 $\pm$ 1,9fg
	0,980	37,8 $\pm$ 1,5jk	31,8 $\pm$ 1,5j	36,7 $\pm$ 0,6h	35,5 $\pm$ 1,0fg
C4	0,995	43,9 $\pm$ 3,8j	31,7 $\pm$ 2,8j	37,8 $\pm$ 5,1h	32,4 $\pm$ 0,6fg
	0,980	37,1 $\pm$ 1,1jk	35,4 $\pm$ 1,1ij	37,0 $\pm$ 0,3h	38,4 $\pm$ 0,5fg
C5	0,995	61,3 $\pm$ 2,0i	47,2 $\pm$ 1,3i	51,6 $\pm$ 3,7gh	57,2 $\pm$ 10,6ef
	0,980	52,4 $\pm$ 1,8ij	42,0 $\pm$ 0,8i	60,1 $\pm$ 12,8g	47,8 $\pm$ 3,6f
C6	0,995	71,6 $\pm$ 14,8h	61,9 $\pm$ 3,6h	60,3 $\pm$ 7,0g	94,6 $\pm$ 50,0de
	0,980	85,6 $\pm$ 3,0gh	65,9 $\pm$ 7,0gh	75,8 $\pm$ 8,9ef	113,2 $\pm$ 23,8cd
C7	0,995	65,7 $\pm$ 1,7i	63,0 $\pm$ 13,8h	65,0 $\pm$ 11,8fg	57,1 $\pm$ 3,4ef
	0,980	70,0 $\pm$ 9,2hi	52,4 $\pm$ 2,4hi	70,0 $\pm$ 8,3fg	80,6 $\pm$ 5,9e
C8	0,995	69,8 $\pm$ 1,9hi	75,2 $\pm$ 5,6fg	65,1 $\pm$ 1,2fg	76,0 $\pm$ 8,3e
	0,980	73,0 $\pm$ 2,2gh	64,6 $\pm$ 7,0gh	83,4 $\pm$ 3,5de	90,9 $\pm$ 4,6de
C9	0,995	220,6 $\pm$ 10,7 <sup>a</sup>	202,8 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>	169,3 $\pm$ 22,4a	165,0 $\pm$ 44,2ab
	0,980	149,6 $\pm$ 6,4cd	126,6 $\pm$ 1,4c	154,5 $\pm$ 12,2a	173,7 $\pm$ 2,4a
C10	0,995	88,4 $\pm$ 1,1g	74,9 $\pm$ 6,7fg	68,1 $\pm$ 2,9fg	97,4 $\pm$ 19,7d
	0,980	103,6 $\pm$ 16,5f	66,3 $\pm$ 3,2g	73,7 $\pm$ 8,9f	133,6 $\pm$ 18,4bc

<b>C11</b>	0,995	99,3 ± 4,6fg	92,4 ± 11,0e	81,5 ± 0,9de	120,4 ± 12,2cd
	0,980	92,0 ± 12,2fg	70,0 ± 7,4fg	77,4 ± 2,5ef	119,4 ± 9,9cd
<b>C12</b>	0,995	90,2 ± 8,5fg	91,5 ± 7,4e	75,0 ± 8,8f	117,6 ± 39,7cd
	0,980	92,8 ± 10,0fg	77,9 ± 2,9fg	80,5 ± 0,7e	124,0 ± 9,6c
<b>C13</b>	0,995	153,6 ± 8,7c	103,4 ± 1,5d	107,7 ± 29,7c	126,8 ± 17,5c
	0,980	119,4 ± 14,5e	79,8 ± 3,1f	103,0 ± 34,7cd	150,0 ± 20,8b
<b>C14</b>	0,995	148,3 ± 34,1cd	99,0 ± 23,3de	101,7 ± 19,9cd	111,4 ± 16,6d
	0,980	196,3 ± 10,8b	140,8 ± 13,4b	126,3 ± 18,7b	167,9 ± 18,7ab
<b>C15</b>	0,995	138,0 ± 3,0d	120,4 ± 17,9c	107,7 ± 29,3c	142,6 ± 32,5bc
	0,980	91,9 ± 1,3fg	85,6 ± 1,8ef	95,7 ± 4,3d	153,0 ± 12,3b
<b>C16</b>	0,995	100,3 ± 5,6fg	101,4 ± 14,6d	98,1 ± 14,5d	110,6 ± 42,8d
	0,980	132,0 ± 10,6de	119,4 ± 19,2c	121,2 ± 8,3bc	165,0 ± 12,0ab

Los valores medios con letras diferentes, dentro de la misma columna, son estadísticamente significativos según el Test de LSD ( $p < 0,0001$ ). Tratamientos: **C0**: sin pesticidas, **C1**: 100 mM de glifosato + 0,3 mM de clorpirifós, **C2**: 100 mM de glifosato + 0,8 mM de clorpirifós, **C3**: 100 mM de glifosato + 1,4 mM de clorpirifós, **C4**: 100 mM de glifosato + 2 mM de clorpirifós, **C5**: 300 mM de glifosato + 0,3 mM de clorpirifós, **C6**: 300 mM de glifosato + 0,8 mM de clorpirifós, **C7**: 300 mM de glifosato + 1,4 mM de clorpirifós, **C8**: 300 mM de glifosato + 2 mM de clorpirifós, **C9**: 400 mM de glifosato + 0,3 mM de clorpirifós, **C10**: 400 mM de glifosato + 0,8 mM de clorpirifós, **C11**: 400 mM de glifosato + 1,4 mM de clorpirifós, **C12**: 400 mM de glifosato + 2 mM de clorpirifós, **C13**: 500 mM de glifosato + 0,3 mM de clorpirifós, **C14**: 500 mM de glifosato + 0,8 mM de clorpirifós, **C15**: 500 mM de glifosato + 1,4 mM de clorpirifós, **C16**: 500 mM de glifosato + 2 mM de clorpirifós

**Tabla 18:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ) y los tratamientos (T) y su interacción sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. sección Flavi* en el AESO.

Cepas	Fuente de variación	df <sup>†</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
			MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>	MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
<b>AM1</b>	T	16	17,14	142,99*	13734,32	152,28*
	$a_w$	1	1,45	12,12	352,58	3,91*
	T x $a_w$	16	1,26	10,51*	1132,64	12,56*
<b>AM2</b>	T	16	13,18	101,13*	9018,92	130,17*
	$a_w$	1	6,37	48,85*	1720,77	24,84*
	T x $a_w$	16	1,49	11,44*	897,64	12,96*
<b>GM3</b>	T	16	13,00	97,55*	8068,49	50,75*
	$a_w$	1	4,14	31,07*	413,18	2,60
	T x $a_w$	16	0,78	5,86*	192,50	1,21
<b>GM4</b>	T	16	12,09	72,63*	14231,64	39,96*
	$a_w$	1	10,34	62,16*	5032,03	14,13
	T x $a_w$	16	1,26	7,57*	575,91	1,62

<sup>†</sup> Grados de libertad.

<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

<sup>§</sup> F-Snedecor.

\* Significancia  $p < 0,001$

Mediante este ensayo se pudo comprobar que las cuatro cepas de *A. sección Flavi* son capaces de tolerar combinaciones de glifosato y clorpirifós en altas concentraciones en un medio a base de sustrato natural. Con respecto a la  $a_w$ , tanto en los tratamientos con los pesticidas solos como en combinación, en general la velocidad de crecimiento resultó mayor a la  $a_w$  más elevada (0,995).

Cuando se evaluaron los pesticidas por separado (puntos II.V.1.1 y II.V.1.2), se observó que a medida que se incrementó la concentración de glifosato en el medio de cultivo la

velocidad de crecimiento de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* disminuyó. Mientras que con clorpirifós, ese comportamiento no fue evidenciado en todos los tratamientos. A las concentraciones más bajas de clorpirifós ensayadas (0,3 y 0,6 mM) la velocidad de crecimiento de las cuatro cepas se mantuvo relativamente constante; a partir del tratamiento con 0,8 mM de insecticida, este parámetro disminuyó mientras la concentración de clorpirifós aumentó. En concordancia con estos resultados, los tratamientos combinados donde se mantuvo constante la concentración de clorpirifós se observó que la velocidad de crecimiento de las cuatro cepas ensayadas disminuyó a medida que aumentó la concentración de glifosato presente en el medio de cultivo; y por el contrario, cuando la concentración de glifosato se mantuvo constante, al incrementarse la concentración de clorpirifós este parámetro de crecimiento resultó variable. En cuanto a la DL50, el glifosato aplicado de manera individual logró reducir en más del 50% el crecimiento de las cepas ensayadas (DL50= 200 a 500 mM); mientras que esto no fue observado con clorpirifós. Esto resulta consistente con lo obtenido en los tratamientos combinados, ya que la mezcla de pesticidas que en general provocó una reducción de más del 50% en la velocidad de crecimiento de la mayoría de las cepas fue aquella compuesta por una alta concentración de glifosato (400 mM) y una baja concentración de clorpirifós (0,3 mM).

En cuanto a la fase de latencia previa al crecimiento, los resultados obtenidos del ensayo con los pesticidas adicionados individualmente fueron similares, ya que en ambos experimentos a medida que aumentó la concentración de pesticida la fase de latencia también lo hizo. Esto también fue evidenciado en los tratamientos combinados donde la concentración de clorpirifós se mantuvo constante, es decir que, a medida que la cantidad de glifosato aumentó la duración de este parámetro de crecimiento fue mayor. En cambio, con concentraciones crecientes de clorpirifós, en general las fases de latencia se mantenían relativamente constantes; siendo evidente que, en los tratamientos con la más baja concentración de glifosato, la duración de las fases de latencia fue similar a la del control (sin pesticidas) independientemente del incremento en la concentración de clorpirifós (tratamientos C1 al C4).

Actualmente no existen estudios ecofisiológicos similares donde se evalúe el efecto combinado de herbicidas e insecticidas sobre el crecimiento fúngico.

## II.VI- Conclusiones

En base a la evaluación y discusión de los resultados de este capítulo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Las especies no toxicogénicas de *A. sección Flavi* en los ensayos *in vitro* mostraron capacidad de tolerar diferentes dosis de glifosato y clorpirifós usadas habitualmente en los cultivos de soja y maíz, como así también concentraciones más elevadas de estos pesticidas.
- Con las concentraciones de clorpirifós evaluadas (100 a 700 mg/L) no se obtuvo la DL 50, es decir no se logró reducir en un 50% el crecimiento fúngico con respecto al control.
- Los parámetros utilizados para evaluar el crecimiento en medio sólido, tales como velocidad de crecimiento y fase de latencia, se modificaron significativamente en presencia de algunas concentraciones de glifosato y clorpirifós en todas las cepas ensayadas.
- Las cuatro cepas de *A. sección Flavi* no toxicogénicas ensayadas fueron capaces de desarrollar en un medio sintético adicionado con los pesticidas como única fuente de carbono, fósforo y/o nitrógeno; observándose cambios evidentes en las características morfológicas de las colonias al variar la composición de los medios de cultivo.
- El aumento de la fase de latencia en los medios adicionados con los pesticidas indicaría el carácter inductivo del proceso de degradación.
- El glifosato adicionado como fuente de nitrógeno provocó el mayor aumento en la velocidad de crecimiento en todas las cepas ensayadas; sin diferencias significativas en éste parámetro al comparar los medios donde el pesticida se utilizó como fuente de carbono y/o fósforo.
- Los mayores valores de velocidad de crecimiento se registraron en el medio CZ completo mientras que los valores más bajos fueron observados en el medio de cultivo donde el clorpirifós reemplazó la fuente carbonada (CZC). Este parámetro de crecimiento fue significativamente mayor en el medio CZN que en el medio CZP para todas las cepas ensayadas.
- Las cuatro cepas de *A. sección Flavi* son capaces de tolerar combinaciones de glifosato y clorpirifós en altas concentraciones en un medio a base de sustrato natural.



- Cuando se evaluaron los pesticidas individualmente, se observó que a medida que se incrementó la concentración de glifosato en el medio de cultivo la velocidad de crecimiento de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* disminuyó. Mientras que con clorpirifós, ese comportamiento no fue evidenciado en todos los tratamientos.
- En los tratamientos combinados donde se mantuvo constante la concentración de clorpirifós se observó que la velocidad de crecimiento de las cuatro cepas ensayadas disminuyó a medida que aumentó la concentración de glifosato presente en el medio de cultivo. Por el contrario, cuando la concentración de glifosato se mantuvo constante, al incrementarse la concentración de clorpirifós este parámetro de crecimiento resultó variable.
- En cuanto a la fase de latencia, con los pesticidas aplicados de manera individual a medida que aumentó la concentración de pesticida la fase de latencia también lo hizo. Esto también fue evidenciado en las combinaciones donde la concentración de clorpirifós se mantuvo constante, es decir que, a medida que la cantidad de glifosato aumentó la duración de este parámetro de crecimiento fue mayor. En cambio, con concentraciones crecientes de clorpirifós, en general las fases de latencia se mantuvieron relativamente constantes.

# **CAPÍTULO III**

### Capítulo III. Remoción de glifosato y clorpirifós *in vitro* por *A. oryzae*. Tolerancia a glifosato y clorpirifós por *A. oryzae* en microcosmos de suelo agrícola

#### III.I- Introducción

##### III.I.1- Efecto de la aplicación de pesticidas en las comunidades microbianas del suelo

En la literatura existen diversos estudios acerca de los cambios en distintos parámetros que directa o indirectamente miden la actividad microbiana como actividad dehidrogenasa, respiración del suelo, biomasa microbiana, mineralización del carbono del suelo, entre otros en presencia de distintos pesticidas y tiempos de incubación (Bonfleur y col. 2015; Álvarez-Martín y col. 2016). En un trabajo con atrazina, Bonfleur y col. (2015) observaron que la presencia del herbicida en el suelo durante 21 días de incubación provocó una disminución en la biomasa microbiana, mientras que la mineralización del carbono del suelo se incrementó. En otro trabajo realizado por Álvarez-Martín y col. (2016), midieron actividad dehidrogenasa y respiración del suelo en presencia de distintas dosis de un fertilizante natural del suelo y dos pesticidas (azoxistrobina y pirimicarb) durante 90 días. Estos autores observaron que la actividad dehidrogenasa aumentó al aplicarse el fertilizante junto con las distintas dosis de azoxistrobina aplicadas (2 y 25 mg/Kg), mientras que el otro pesticida provocó una disminución en dicha actividad enzimática. Con respecto a la respiración del suelo, observaron que a medida que aumentó la concentración de ambos pesticidas la respiración también lo hizo, pero fue disminuyendo a lo largo de todo el período de incubación.

Otra forma de evaluar el efecto de los pesticidas en las comunidades microbianas nativas del suelo es analizar la estructura y diversidad de las mismas. Zabaloy y col. (2012) estudiaron el efecto de la aplicación de glifosato (dosis de 15 y 150 mg/kg) en un ensayo en microcosmos con suelos con y sin exposición previa al herbicida sobre la respiración microbiana y también sobre la estructura y abundancia de la comunidad bacteriana del suelo. Estos autores observaron que la adición de glifosato al suelo provocó efectos mínimos tanto en los parámetros de estructura como los de funcionalidad de las comunidades microbianas. Sin embargo, sí observaron diferencias significativas en cuanto a la respiración microbiana luego de los tratamientos con glifosato al comparar los microcosmos de suelo con y sin exposición previa al herbicida. En el suelo sin exposición previa a glifosato observaron un aumento en la respiración microbiana con respecto al tratamiento control, mientras que en el suelo con exposición previa observaron una disminución en este parámetro. Estos resultados indicarían que en el suelo sin antecedentes de exposición a glifosato, la adición del mismo

provocaría un estrés a las comunidades nativas del mismo lo cual se refleja en la respiración exacerbada. Mientras que en el suelo expuesto a glifosato, las especies nativas ya estarían aclimatadas al herbicida y podrían metabolizarlo rápidamente. Más recientemente, este grupo de investigación evaluó el efecto de hasta tres aplicaciones de glifosato (ingrediente activo y formulado comercial) en ensayos en microcosmos con los mismos suelos del trabajo anterior, sobre las comunidades bacterianas y sobre el grupo de bacterias oxidantes de amonio (Allegrini y col. 2017). Estos autores no observaron diferencias significativas en cuanto la abundancia de las comunidades microbianas luego de las aplicaciones del herbicida. Sin embargo, detectaron diferencias significativas en cuanto al grupo de bacterias oxidantes de amonio cuando se aplicó el formulado comercial de glifosato y también el compuesto puro (luego de la tercera aplicación). Esto último indicaría que las aplicaciones repetidas del herbicida provocan cambios en ciertos grupos bacterianos involucrados en procesos claves de los ciclos del carbono y nitrógeno en el suelo. De manera similar, Merlin y col. (2015) determinaron que la abundancia total de la comunidad bacteriana mostró cierta estabilidad durante el período de incubación en dos tipos de suelos analizados (franco arenoso y franco limoso) expuestos a clordecona. No se observó un efecto significativo del pesticida sobre la abundancia relativa de los fila en el suelo franco limoso, pero sí observaron diferencias en algunos fila del suelo franco arenoso. En otro trabajo, Álvarez-Martín y col. (2016) aplicaron un fertilizante y los pesticidas azoxistrobina y pirimicarb al suelo; luego realizaron una extracción de ADN total del suelo y fue secuenciado masivamente el gen de rARN 18s (Illumina). Luego del análisis bioinformático, observaron que el fertilizante provocó un aumento en la riqueza de la comunidad microeucariótica; mientras que la concentración de los pesticidas no afectó significativamente este parámetro. Mientras que, en cuanto a la estructura de la comunidad microbiana, sí encontraron diferencias luego de la aplicación de azoxistrobina y pirimicarb a lo largo de todo el período de incubación. Arango y col. (2014) obtuvieron resultados similares cuando evaluaron el efecto del glifosato en la composición y diversidad de las comunidades bacterianas de la rizósfera de soja transgénica. Estos autores observaron que la abundancia de especies pertenecientes al género *Burkholderia* spp. fue disminuyendo con la aplicación del herbicida, mientras que la abundancia de representantes del phylum *Gemmatimonadetes* aumentó significativamente. En otro trabajo, también se observó que la exposición a glifosato aumentó la abundancia de bacterias pertenecientes a las *Gammaproteobacterias* y por otro lado provocó la disminución de la abundancia relativa de las *Acidobacteria* de la rizósfera de maíz y soja tolerantes a glifosato (Newman y col. 2016).

Con respecto a las comunidades fúngicas existe menos información comparado con los estudios enfocados en bacterias. Anza y col. (2016) estudiaron el efecto de la aplicación de glifosato sobre las comunidades microbianas (bacterias y hongos) de la rizósfera de *Cortaderia selloana* en ensayos en microcosmos. Estos autores analizaron varios parámetros para evaluar la biomasa, actividad y diversidad de estas comunidades (actividades enzimáticas, respiración, contenido de ergosterol, perfiles de amplificación del espacio integénico del rARN: Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA, etc.) y observaron que luego de la aplicación del herbicida, varios de los parámetros relacionados a la actividad fúngica, biomasa y biodiversidad aumentaron. Por el contrario, en un trabajo realizado por Druille y col. (2016), observaron que la aplicación de glifosato en suelo de pastoreo tanto en dosis más bajas que las recomendadas (0,8 L/ha) como aquellas recomendadas (3 L/ha), la viabilidad de esporas de hongos arbusculares micorríticos disminuyó un 56%, lo cual provocó una disminución en la producción de arbusculos en las plantas estudiadas siendo este proceso sumamente beneficioso para la producción de cultivos para pastoreo.

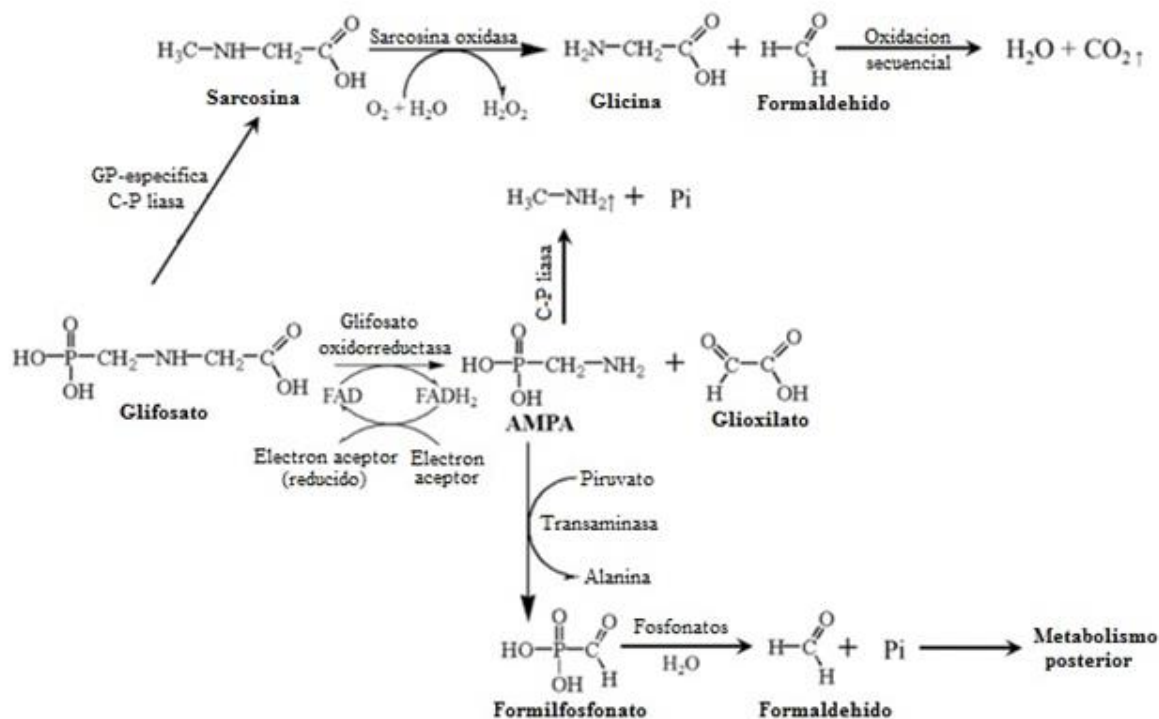
### **III.1.2- Degradación de glifosato y clorpirifós en suelo**

#### **III.1.2.2- Degradación del glifosato en el suelo**

La descomposición de los herbicidas ocurre a través de procesos fotoquímicos, químicos y biológicos. Por otro lado, estudios de campo y en condiciones de luz artificial indican que la fotodegradación del glifosato en suelo es insignificante. Las transformaciones químicas en el suelo incluyen procesos de hidrólisis, oxidación y reacciones con los radicales libres. El glifosato puede presentar una lenta degradación química, pero no es el mecanismo principal de degradación de este herbicida (Shushkova y col. 2010).

La descomposición biológica generalmente se considera como el proceso más importante en la remoción de la mayor parte de los herbicidas. Estos compuestos son inactivados y biodegradados por los microorganismos del suelo con tasas de degradación relacionadas a la actividad microbiana y los factores que afectan esta actividad. Los metabolitos primarios y predominantes de la degradación microbiana son el glioxilato y ácido aminofosfónico (AMPA), que eventualmente se degradan a agua, dióxido de carbono, amonio y fosfato (**Figura 23**). Este proceso se realiza tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias. Si bien el AMPA es también degradado en el suelo, su degradación es, generalmente, más lenta que la del glifosato debido a que su adsorción a partículas de suelo posiblemente es

más fuerte que con el glifosato y/o por la menor posibilidad de penetrar las paredes celulares o las membranas de los microorganismos presentes en el suelo (Sørensen y col. 2006; Zabaloy y col. 2012).



**Figura 23.** Vías de degradación del glifosato (Huang y col. 2016)

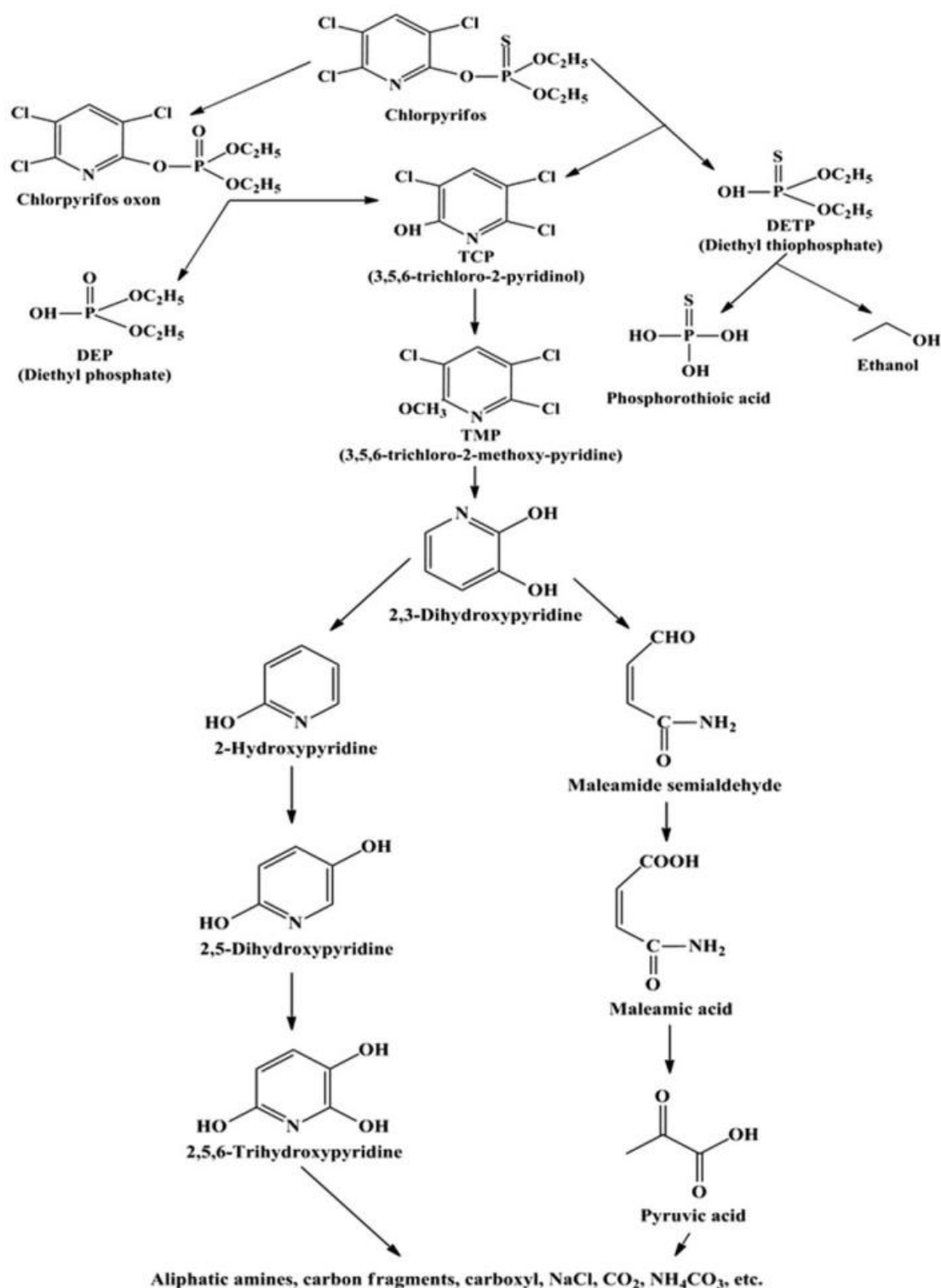
Los hongos pueden utilizar el glifosato como un nutriente y también como un sustrato energético (Krzysko-Lupicka y Orlik 1997; Krzysko-Lupicka y col. 1997; Castro y col. 2007). Algunos estudios muestran que la adición de este componente puede inhibir el crecimiento de hongos micorrízicos y como consecuencia, puede estimular el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Fusarium* en ciertos cultivos (Krzysko-Lupicka y Sudol 2008; Fernandez y col. 2009). Así mismo, se ha informado un incremento en el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces* spp. y otros hongos en medios de cultivo suplementados con glifosato (Wardle y Parkinson 1992; Obojska y col. 1999; Hanson y Fernandez 2003).

En estudios previos se evaluó el efecto del glifosato *in vitro* en el crecimiento de cepas toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi*, observándose una relación directa entre velocidad de crecimiento y concentración del herbicida en un medio de cultivo en base a sustrato (Barberis y col. 2013). Otros estudios realizados con otras especies fúngicas mostraron que el efecto *in vitro* de este herbicida en el crecimiento depende de las

concentraciones ensayadas. En *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* el crecimiento a bajas concentraciones de glifosato no se vio afectado, mientras que a altas concentraciones se observó una inhibición significativa (Larson y col. 2006). En general, las respuestas de las distintas especies fúngicas parecen ser variables y dependientes de la susceptibilidad al herbicida (Anderson y Kolmer 2005; Feng y col. 2005).

### **III.I.2.3- Degradación del clorpirifós en el suelo**

Las tasas de degradación de clorpirifós son influenciadas por factores ambientales como pH, humedad y temperatura del suelo; como así también de las tasas de formulación y aplicación. Tanto los procesos bióticos como los abióticos contribuyen a la degradación de clorpirifós. Un proceso clave es la hidrólisis enzimática, en el cual la tasa aumenta con el pH y la temperatura; y otro proceso importante es la degradación fotolítica del mismo (Gebremariam y col. 2012). Sin embargo la principal ruta de degradación parece ser vía metabolismo aeróbico y anaeróbico. El principal metabolito, 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), es persistente en suelos cuando no está expuesto a la luz (EPA, 2006). La degradación hidrolítica llega a ser la ruta principal de degradación en suelos alcalinos bajo condiciones de humedad escasa, pero se inhibe en concentraciones altas de clorpirifos (1.000 µg/g) (Racke y col. 1996) (**figura 24**).



**Figura 24:** Vías de degradación del clorpirifós (Yadav y col. 2015).

Varios estudios han demostrado que suelos contaminados con pesticidas pueden ser descontaminados por inoculación de microorganismos específicamente adaptados (Diez



2010; Abo-Amer 2011; Massiha y col. 2011). Los suelos con exposición previa al clorpirifós contienen una variedad de microorganismos productores de enzimas degradadoras de organofosforados (Bhagobaty y Malik 2008; Sasikala y col. 2012). Mediante el uso de técnicas de cultivo de enriquecimiento, han sido aisladas varias especies microbianas capaces de utilizar el clorpirifós como única fuente de carbono a partir de suelos contaminados con pesticidas, lodos o aguas residuales (Ghanem y col. 2017; Latifi y col. 2012; Liu y col. 2012; Savitha y Raman 2012). Singh y col. (2003) informaron una biodegradación aumentada de clorpirifós con la inoculación de microorganismos degradadores del insecticida en suelos de Australia y luego esta habilidad fue transferida exitosamente a 5 suelos del Reino Unido.

La mayoría de los estudios evaluaron la degradación por bacterias, pero muy pocos han demostrado que el clorpirifós pueda ser degradado en el suelo por hongos (Yu y col. 2006; Chu y col. 2008; Fang y col. 2008). Yu y col. (2006) aislaron una cepa de *Verticillium* de suelo y se evaluó su capacidad degradadora en experimentos a campo. Estos autores observaron que la adición de esta cepa a suelos contaminados incrementaba significativamente la degradación de clorpirifós. Por otro lado, Massiha y col. (2011) realizaron una experiencia para estudiar la biodegradación del clorpirifós por la microbiota indígena del suelo. Los resultados mostraron que la presencia de bacterias, actinomicetes y hongos del suelo logran degradar rápidamente 25 y 50 mg/Kg de clorpirifós en 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP).

### **III.II- Hipótesis**

Las cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* son tolerantes y potenciales biodegradadores bajo condiciones “*in vitro* e *in situ*” de los pesticidas clorpirifós y glifosato.

### **III.III- Objetivos**

- Poner a punto metodologías para determinar la concentración residual de los pesticidas clorpirifós y glifosato en medios de cultivo.
- Determinar la capacidad de cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* no toxicogénicas de degradar bajo condiciones “*in vitro*” los pesticidas clorpirifós y glifosato.

- Determinar la fitotoxicidad de los posibles metabolitos intermediarios producidos en la degradación “*in vitro*” de los pesticidas clorpirifós y glifosato por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*.
- Evaluar *in situ* la capacidad de cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* de tolerar diferentes dosis de clorpirifós y glifosato usadas habitualmente en los suelos destinados al cultivo de soja y maíz.

### **III.IV- Materiales y métodos**

#### **III.IV.1- Metodología**

##### **III.IV.1.1- Evaluación de la remoción *in vitro* de glifosato por *A. oryzae* en medio sintético**

##### **III.IV.1.1.1- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como fuente única de fósforo y nitrógeno**

Para este ensayo se utilizaron las cepas de *A. oryzae*: AM1 y AM2 para evaluar la remoción de dos concentraciones diferentes de glifosato (1 y 1,5 mM). La selección de estas cepas se realizó debido a que presentaron los mejores parámetros de crecimiento en los ensayos de crecimiento anteriores. El medio de cultivo sintético CZ se modificó reemplazando la fuente de fósforo (CZP) o nitrógeno (CZN) por glifosato a la concentración de 1 y 1,5 mM, respectivamente. Se prepararon frascos Erlenmeyers con 100 mL de los medios de cultivo anteriores y se inocularon con una suspensión de conidios de las cepas a evaluar de  $10^6$  conidios/mL. Dicha suspensión se preparó cosechando los conidios de la superficie de la placa de AEM en un tubo con agua destilada y tween 80 como agente dispersante. Se realizó un recuento de conidios en cámara de Neubauer y se ajustó el volumen de agua para llevar a la concentración de  $10^6$  conidios/mL. Se incluyeron los controles correspondientes: frascos Erlenmeyers con el medio CZ completo sin glifosato, frascos con CZ modificado con el herbicida pero sin inocular y CZ modificado con el herbicida inoculado con la suspensión de conidios inactivada (CZP y CZN). Todos los tratamientos se incubaron en agitación (150 rpm) a 28°C por 15 días.

Se recolectaron submuestras (2 mL) de cada cultivo inmediatamente después de la adición del herbicida (control) y cada dos días hasta finalizado el período de incubación. La

concentración residual del glifosato fue determinada por HPLC. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y el ensayo se repitió tres veces.

#### **III.IV.1.1.2. Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como única fuente de fósforo en altas concentraciones**

Se seleccionó la cepa *A. oryzae* AM1 para evaluar la degradación de diferentes concentraciones del herbicida como única fuente de fósforo. El medio de cultivo sintético CZ se modificó reemplazando la fuente de fósforo por glifosato a la concentración de 10 mM (diez veces más de la concentración de fósforo del medio de cultivo). Se prepararon frascos Erlenmeyers con 100 mL de medio de cultivo y se inocularon con una suspensión de conidios de la cepa de  $10^6$  conidios/mL. Dicha suspensión se preparó cosechando los conidios de la superficie de la placa de AEM en un tubo con agua destilada y tween 80 como agente dispersante. Se realizó un recuento de conidios en cámara de Neubauer y se ajustó el volumen de agua para llevar a la concentración de  $10^6$  conidios/mL. Se incluyó un tratamiento control con el medio CZ completo. Todos los tratamientos se incubaron en agitación (150 rpm) a 28°C por 15 días.

Se recolectaron submuestras siguiendo la metodología detallada en el punto **III.IV.1.1.1** y la detección y cuantificación se realizó por HPLC. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y el ensayo se repitió tres veces.

#### **III.IV.1.1.3- Extracción y detección de glifosato del medio de cultivo**

Para la derivatización se siguió la metodología propuesta por Ibáñez y col. (2005). Se tomó 1 mL de las submuestras y se le agregó 60 µL de buffer borato de sodio (pH 9) y 60 µL de 9-fluorenylmethyl cloroformato (FMOC) (Sigma Aldrich, Argentina) de concentración 12.000 mg/L. Se dejó reposar 12 hs y luego se acidificó hasta pH 1,5 con HCl 6 M. Se filtró y se centrifugó a 13.000 rpm por 20 min. Los residuos de glifosato se determinaron utilizando un equipo de HPLC de fase reversa con un sistema de detección de fluorescencia (Waters e2695; Waters, Milford, MA, USA). Las separaciones cromatográficas se desarrollaron en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm d.i., tamaño de partícula 5 µm, Luna-Phenomenex, Torrance, CA) conectada a una precolumna SecurityGuard KJO-4282 (20 x 4,6 mm d.i., tamaño de partícula 5 µm, Phenomenex). La velocidad de flujo utilizada fue de 1 mL/min y se programó un gradiente con buffer fosfato pH 2 (bomba A) y acetonitrilo (bomba B). El programa comenzó con el solvente A al 70% por 10 min y luego se disminuyó a 5%

dentro del siguiente minuto y se mantuvo por 3 min. Seguido a esto el solvente A fue aumentando al 70% inicial por 1 min y se mantuvo hasta el final de la corrida cromatográfica (20 min). El tiempo de retención fue de 6,3 min para el glifosato y de 8,4 para el AMPA. El análisis se realizó a una longitud de onda de excitación de 266 nm y de emisión de 315 nm, el glifosato y el AMPA se cuantificaron correlacionando la altura del pico de las muestras con la altura de los picos de las curvas estándar. El límite de detección del método analítico fue 1 ng/mL de muestra.

La concentración de glifosato y AMPA (mM) se graficó en función del tiempo (días) para calcular el porcentaje de degradación en cada condición ensayada; y en las muestras que se detectó AMPA, la cantidad producida.

Con el objetivo de confirmar la presencia de AMPA en las muestras se siguió la metodología propuesta por Aparicio y col. (2013) utilizando UPLC MS/MS. Estos análisis fueron llevados a cabo en colaboración con la estación experimental INTA Balcarce.

#### **III.IV.1.1.4- Evaluación de la fitotoxicidad de los productos de degradación de glifosato por la cepa de *A. oryzae* AM1**

Se seleccionaron para este ensayo semillas de lechuga (*Latuca sativa*) para evaluar la toxicidad de los posibles metabolitos intermediarios generados durante la degradación de glifosato por *A. oryzae* AM1. Se eligieron estas semillas porque se conoce su sensibilidad al herbicida glifosato (Lallana y col. 2013). Se utilizaron extractos de cultivos de *A. oryzae* AM1 en medio CZ modificado. El glifosato se adicionó al medio de cultivo CZ como única fuente de fósforo (1 mM) o nitrógeno (1,5 mM). Además se realizaron 3 tratamientos controles: CZ sin glifosato inoculado con la cepa fúngica, CZ con glifosato sin inocular (CZP o CZN), CZ sin glifosato sin inocular. Estos extractos se tomaron a los 0, 7, 14 y 21 días de incubación de los cultivos a 25°C.

Se prepararon placas de Petri estériles con papel de filtro a las cuales se les adicionó 2 mL de cada extracto de medio de cultivo. Se incluyó un control de la germinación al cual se le adicionó 2 mL de agua destilada. Con una pinza estéril se colocaron 20 semillas de lechuga por placa dejando espacio suficiente entre las semillas. Las placas se sellaron con parafilm para evitar la pérdida de humedad. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Posteriormente, las placas se cubrieron con bolsas de plástico oscuras y se incubaron a 20°C por 5 días (Álvarez y col. 2015).

Al finalizar el tiempo de incubación se registró el número de plantas germinadas, largo de radícula y largo de hipocótilo a fin de calcular el porcentaje de germinación y el índice de vigor (IV).

#### **III.IV.1.2- Evaluación *in vitro* de la remoción de clorpirifós por *A. oryzae* en medio sintético**

Se seleccionaron dos cepas de *A. oryzae*: AM1 y AM2 para evaluar la degradación de tres concentraciones diferentes de clorpirifós (5, 10 y 20 mM). Para estos ensayos también se seleccionaron estas cepas debido a que presentaron los mejores parámetros de crecimiento en los ensayos de crecimiento anteriores. El medio de cultivo sintético CZ se ajustó a tres  $a_w$ : 0,98; 0,95 y 0,93 mediante la adición de distintas cantidades de glicerol (Dallyn y Fox 1980). Se colocó 50 mL de CZ estéril sin pesticida en frascos Erlenmeyers y luego se inocularon con un taco de agar (3 mm) tomado de los márgenes de cultivos en crecimiento de cada cepa en AEM. A cada frasco se le adicionó la cantidad necesaria de clorpirifós para alcanzar las concentraciones deseadas. Se incluyeron los controles correspondientes como se detalló en el punto III.IV.1.1.1 para glifosato.

Se recolectaron submuestras (1 mL) de cada cultivo inmediatamente después de la adición del insecticida (control) y a 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 30 días; y la concentración residual del pesticida fue determinada por HPLC. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado y el ensayo se repitió tres veces.

##### **III.IV.1.2.1- Extracción y detección de clorpirifós**

Las submuestras de 1 mL del medio líquido se mezclaron con 2 mL de una solución de acetonitrilo:metanol (80:20 v:v) y se agitó vigorosamente por 30 seg. Las mezclas se pasaron a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Whatman) y los filtrados obtenidos se analizaron por HPLC (Karas y col. 2011). Los residuos de clorpirifós en el filtrado se determinaron utilizando un equipo de HPLC de fase reversa con un sistema de detección de fluorescencia. El sistema de HPLC consistió de una bomba Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA, USA) conectado a un detector de fluorescencia programable Hewlett Packard 1046 y ambos conectados a una estación Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas se desarrollaron en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm i.d., tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ , Luna-Phenomenex, Torrance, CA) conectada a una precolumna SecurityGuard KJO-4282 (20 x 4,6 mm d.i., tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex). La velocidad de flujo utilizada fue de 1

mL/min y se programó un gradiente con acetonitrilo (bomba A) y 20:80 (v:v) metanol:agua, 0,5 mL/L de ácido acético (bomba B). El programa comenzó con el solvente A al 20% por 1 min y luego se incrementó a 80% dentro de los siguientes 5 min y se mantuvo por 4 min. Seguido a esto el solvente A fue disminuyendo al 20% inicial hasta el final de la corrida cromatográfica (20 min). El tiempo de retención fue de 9,9 min. El análisis se realizó a una longitud de onda de 300 nm, el clorpirifós se cuantificó correlacionando la altura del pico de las muestras con la altura de los picos de las curvas estándares. El límite de detección del método analítico fue 1 ng/mL de muestra.

La concentración de clorpirifós (mM) se graficó en función del tiempo (días) para calcular el porcentaje de degradación de cada condición ensayada.

#### **III.IV.1.2.2- Evaluación de la fitotoxicidad de los productos de degradación de clorpirifós por la cepa de *A. oryzae* AM1**

Se seleccionó para este ensayo semillas de lechuga (*Latuca sativa*) para evaluar la toxicidad de los posibles metabolitos intermediarios generados durante la degradación de clorpirifós por *A. oryzae* AM1. Se eligieron estas semillas debido a que se conoce su sensibilidad al insecticida clorpirifós (Iannacone y col. 2000). Se utilizaron extractos de cultivos de *A. oryzae* AM1 en medio CZ modificado. El clorpirifós se adicionó al medio de cultivo CZ como única fuente de carbono (5, 10 y 20 mM). Además se realizaron 3 tratamientos controles: CZ sin clorpirifós e inoculado con la cepa fúngica, CZ con clorpirifós sin inocular, CZ sin clorpirifós sin inocular. Estos extractos se tomaron a los 0, 7, 14 y 21 días de incubación de los cultivos a 25°C.

Se prepararon placas de Petri siguiendo la metodología propuesta por (Álvarez y col. 2015) detallada en el punto III.IV.1.1.4 para glifosato.

Al finalizar el tiempo de incubación se registró el número de plantas germinadas, largo de radícula y largo de hipocótilo a fin de calcular el porcentaje de germinación y el índice de vigor (IV).

### III.IV.1.3- Evaluación *in situ* de la tolerancia a glifosato y clorpirifós por cepas de *A. oryzae* no toxicogénicas previamente seleccionadas en presencia de la microbiota nativa

#### III.IV.1.3.1- Preparación y acondicionamiento de los microcosmos

El ensayo se realizó mediante el uso de microcosmos preparados con suelos, de características similares a los analizados en los capítulos anteriores, con antecedentes de una prolongada exposición a diferentes pesticidas y destinados al cultivo extensivo de soja y maíz. Se dispusieron recipientes plásticos con 1 kg de suelo acondicionado a dos capacidades de campo (CC) (30 y 70%).

Previamente se realizó con el mismo suelo una experiencia para calcular la concentración de agua que era necesaria agregar para llevar a la CC requerida en el ensayo.

La CC representa el contenido de humedad del suelo, cuando el agua que éste contiene, deja de fluir por gravedad, cuando este fenómeno ocurre, el agua libre o gravitacional deja de existir en el suelo. Para la determinación de la CC inicial del suelo, las muestras se secaron al aire y se tamizaron por una malla de 2 mm para separar restos de vegetales y piedras; luego se colocaron en tubos plásticos transparentes de 10 cm de largo por 4 cm de diámetro interno. En el extremo inferior del tubo se colocó un papel de filtro con un tapón perforado y se adicionaron 25 g de suelo para lograr una compactación similar a la del campo (Rivera Martínez y col. 2009).

Posteriormente se agregó entre 4 a 7 mL de agua destilada a la columna de suelo, y se dejó reposar 16 horas aproximadamente. Se retiró la muestra para registrar su peso húmedo y seco, previo secado en estufa de aire forzado.

La CC se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$CC = \frac{P_{SH} - P_{SS}}{P_{SS}} \times 100$$

$P_{SH}$  = Peso suelo húmedo

$P_{SS}$  = Peso suelo seco

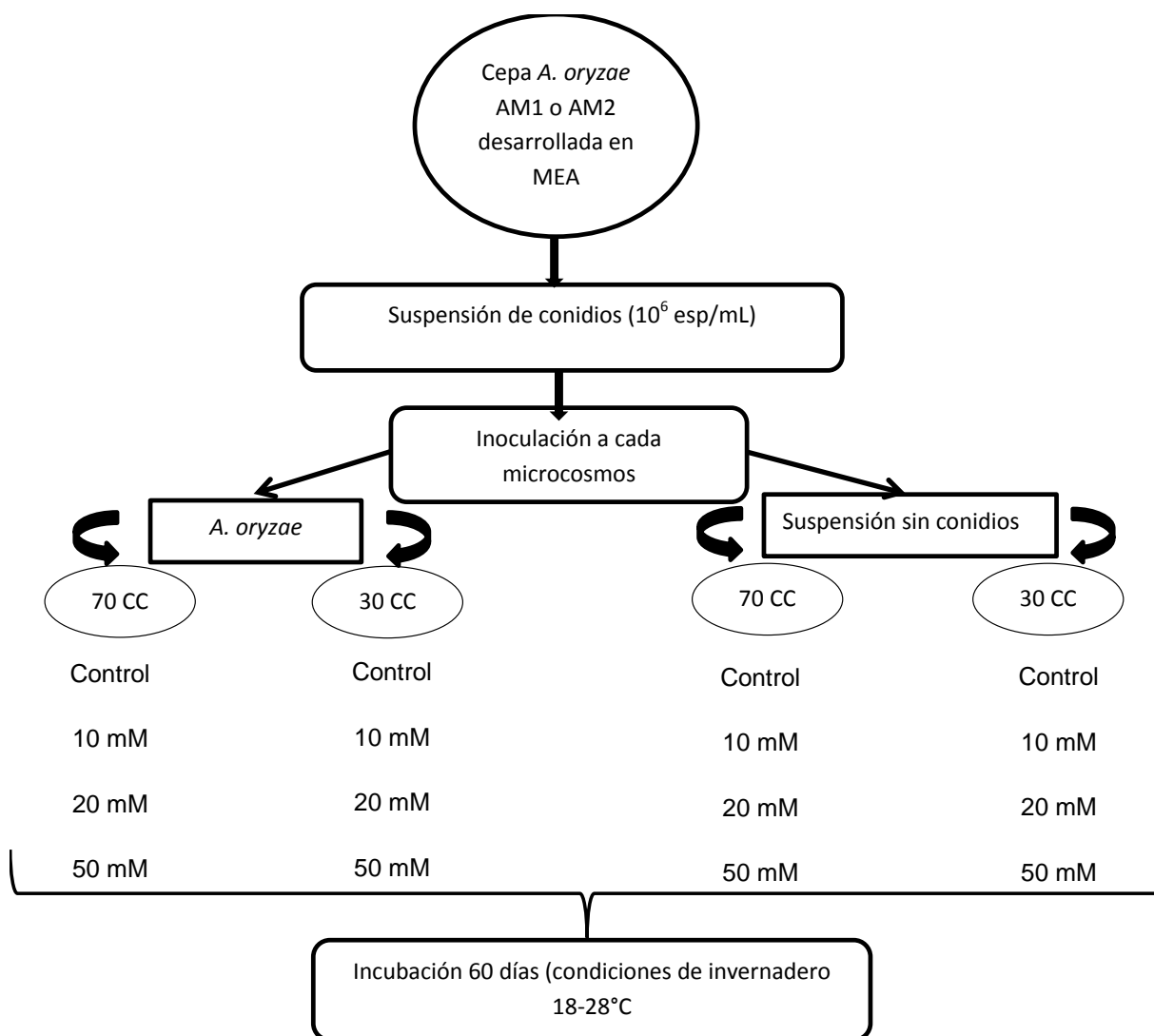
Además, a cada microcosmos acondicionado a su correspondiente CC se le agregaron diferentes volúmenes de la solución de glifosato (1 M) o clorpirifós (1 g/L) para llegar a las concentraciones finales de 10, 20 y 50 mM. A los microcosmos controles se les agregó igual volumen de agua que el de la solución de pesticida correspondiente. Se homogeneizó

cuidadosamente el contenido de cada recipiente para permitir una distribución equitativa del pesticida en el suelo.

#### III.IV.1.3.2- Inoculación de los microcosmos

En la **figura 25** se muestra el protocolo que se siguió para el acondicionamiento e inoculación de los microcosmos. Se utilizaron las cepas de *A. oryzae* AM1 y AM2 no productoras de AFs y ACP. Estas cepas fueron seleccionadas por poseer los mejores parámetros de crecimiento en los ensayos realizados en medio agar extracto de suelo (mayor velocidad de crecimiento y menor longitud de la fase lag en presencia de los pesticidas) y buenos porcentajes de remoción de los mismos en medio de cultivo sintético. A partir de la cepa *A. oryzae* AM1 o AM2, desarrollada en AEM durante 7 días a 25°C, se realizó una suspensión de conidios. Dicha suspensión se preparó cosechando los conidios de la superficie de la placa de AEM en un tubo con agua destilada y tween 80 como agente dispersante. Se realizó un recuento de conidios en cámara de Neubauer y se ajustó el volumen de agua para llevar a la concentración de  $10^6$  conidios/mL. Luego 50 mL de esta suspensión fueron inoculados a cada microcosmos, los mismos fueron incubados en condiciones de invernadero durante 60 días en los meses de septiembre a noviembre a temperaturas primaverales (18-28°C). Para cada condición de CC se incluyó el correspondiente control sin el agregado de la cepa fúngica. En ese caso un volumen igual de suspensión sin conidios se adicionó para no alterar las condiciones del microcosmos. Cada tratamiento se realizó por triplicado.





**Figura 25:** Esquema de acondicionamiento, inoculación e incubación del ensayo en microcosmos.

#### III.IV.1.3.2- Aislamiento, recuento e identificación de la micobiota de los microcosmos

A los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días de incubación se realizó el aislamiento de la micobiota de cada microcosmos por el método de diseminación en superficie. Se tomaron 10 g de cada muestra de suelo y se homogeneizaron en un agitador con 90 mL de agua peptonada al 0,1% por 30 minutos. Se realizaron diluciones seriadas factor 10 de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , luego se tomaron alícuotas de 0,1 mL de cada dilución y se sembraron por duplicado sobre el medio DRBC. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 a 7 días. Al final del período de incubación, se seleccionaron las placas que contenían entre 10 y 100 colonias y se realizó el recuento de la micobiota general y de cada género fúngico. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g). El recuento fúngico total, de

cada género, y de la cepa *A. oryzae* AM1 inoculada se expresó en Log<sub>10</sub> UFC/g. Se evaluó la evolución en el tiempo de la cepa inoculada en relación a la microbiota nativa.

#### **III.IV.1.4- Análisis estadístico de los datos**

Los análisis de los datos se realizaron mediante el análisis de varianza. La prueba de Fisher (LSD) se utilizó para determinar las diferencias significativas entre la concentración residual de pesticida, porcentaje de germinación, recuento fúngico o el porcentaje de muestras contaminadas por los diferentes géneros y especies analizadas. Los recuentos de hongos y los datos porcentuales se transformaron usando una función logarítmica Log 10 (x + 1) antes de aplicar el análisis de la varianza. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat, 2010p de la Universidad Nacional de Córdoba.

#### **III.IV.2- Materiales**

##### **III.IV.2.1- Medios de cultivo**

-Caldo Czapeck: sacarosa 30 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,25 g, KCl 0,5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,01 g, agua destilada cnp 1000 mL.

##### **III.IV.2.2- Soluciones**

-Solución de glifosato: se preparó una solución madre de concentración 2 M. Se tomaron 14,4 mL de glifosato comercial (Roundup 1®, 3,5 mol/L de ingrediente activo) y se enrasaron con agua destilada en 25 mL. Cuando se utilizó Roundup Ultramax® (cantidad de principio activo: 680 g/Kg) se preparó una solución madre de concentración 2 M. Se pesaron 2,26 g y se disolvieron en 50 mL de agua destilada.

-Solución de clorpirifós: se preparó una solución madre de concentración 1 g/L. Se tomaron 0,95 mL de clorpirifós comercial (Hortal®) y se enrasaron con agua destilada en 100 mL. Cantidad principio activo: 10,5 g/100 mL.

-Buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: se pesó 0,843 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se disolvió en 1000 mL de agua calidad HPLC. Se ajustó a pH 2 con ácido ortofosfórico.

-Buffer Borato de Sodio: se mezclaron 8,8 mL de una solución de Na(OH) 0,1 N y 50 mL  $B_4O_7Na_2 \cdot 10H_2O$  0,025 M y se enrasó a 100 mL con agua destilada.

-Solución de 9-fluoronometil cloroformato FMOC: se pesó 0,06 g de FMOC (Sigma Aldrich) y se enrasó a 10 mL con acetonitrilo.

### III.V- Resultados y discusión

#### III.V.1- Evaluación de la remoción *in vitro* de glifosato y clorpirifós por *A. oryzae* en medio sintético

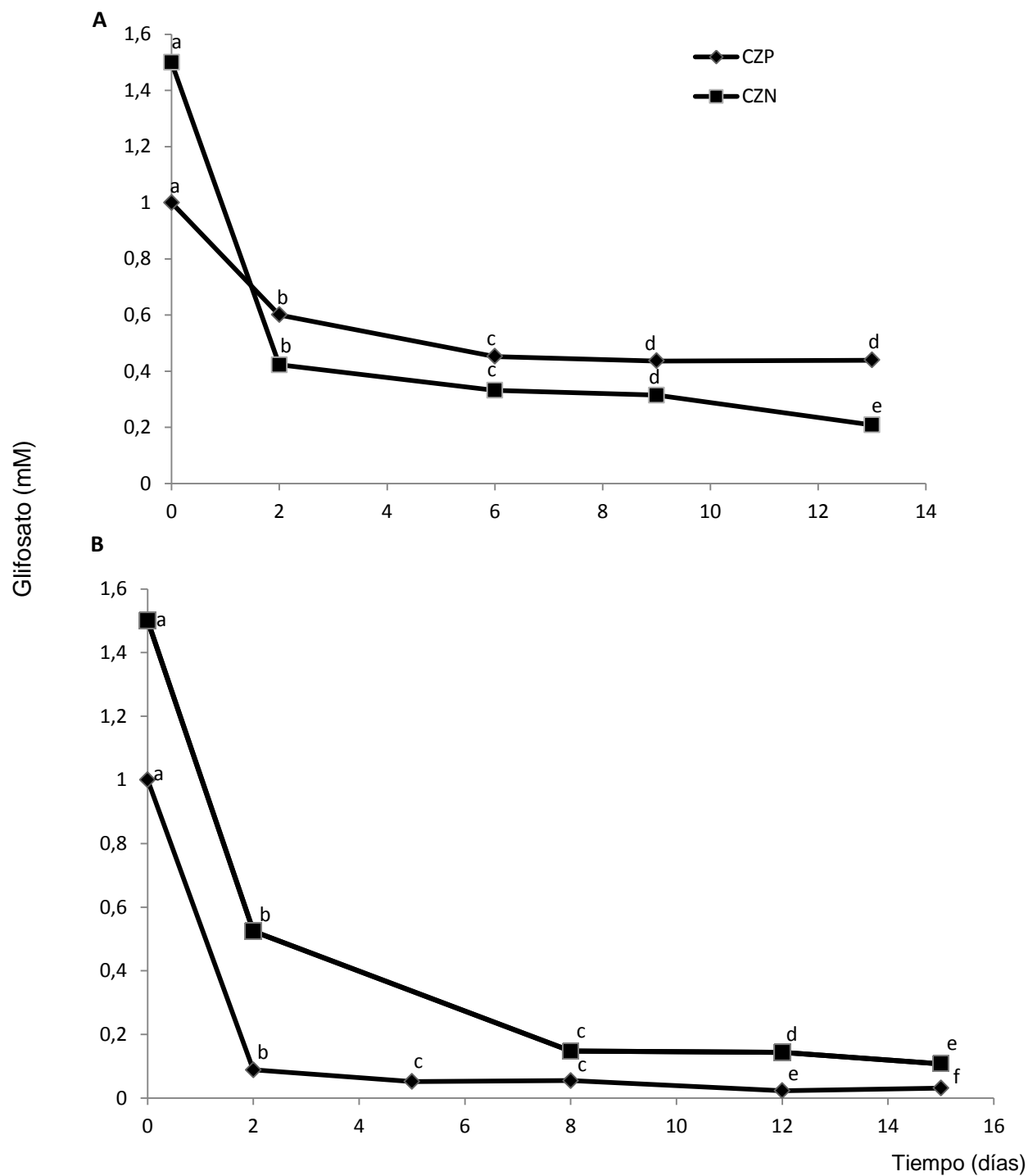
##### III.V.1.1- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como única fuente de fósforo y nitrógeno

En la **figura 26** se observa la degradación de glifosato como única fuente de fósforo (CZP) y de nitrógeno (CZN) a 28°C por dos cepas de *A. oryzae* AM1 (**A**) y AM2 (**B**). Ambas cepas fueron capaces de degradar el herbicida en las dos condiciones ensayadas con porcentajes de degradación mayores al 50% al final del período de incubación (15 días).

Para la cepa AM1 los valores de degradación registrados fueron diferentes de acuerdo a la condición ensayada. Luego de dos días de incubación, se observó que la concentración residual de pesticida en el medio de cultivo había disminuido en un 39,9 y 71,8% cuando el glifosato fue adicionado como fuente de fósforo y nitrógeno, respectivamente. El porcentaje de degradación final fue de 56% cuando el glifosato reemplazó la fuente de fósforo y de 86% cuando el glifosato reemplazó la fuente de nitrógeno.

Por el contrario, para la cepa AM2 los valores de degradación fueron similares en ambas condiciones. Cuando el glifosato reemplazó la fuente de fósforo, el 91% fue degradado en los primeros dos días de incubación y luego se mantuvo relativamente constante hasta el final del período de incubación; alcanzando un porcentaje de degradación final de 96%. Cuando el herbicida reemplazó la fuente nitrogenada, el porcentaje de degradación en los primeros días de incubación alcanzó sólo el 65%; pero al final del ensayo este porcentaje aumentó hasta llegar al 93% de degradación.

El análisis estadístico permitió corroborar que la remoción del herbicida a medida que transcurrió el tiempo resultó significativa (**Tabla 19**).



**Figura 26:** Remoción de glifosato en caldo Czapeck con glifosato como única fuente de fósforo (CZP) o nitrógeno (CZN) a 28°C por *A. oryzae* AM1 (A) y AM2 (B). Los valores con letras distintas dentro del mismo tratamiento son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD.

**Tabla 19:** Análisis de la varianza de la remoción del glifosato en los distintos medios de cultivo por las cepas de *A. oryzae*

Cepas	Medio de cultivo	Remoción de glifosato	
		MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
AM1	CZP	0,18	14474249664423700*
	CZN	0,85	4811079271577380*
AM2	CZP	0,45	17664269974603900*
	CZN	1,05	4579652987374840*

<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

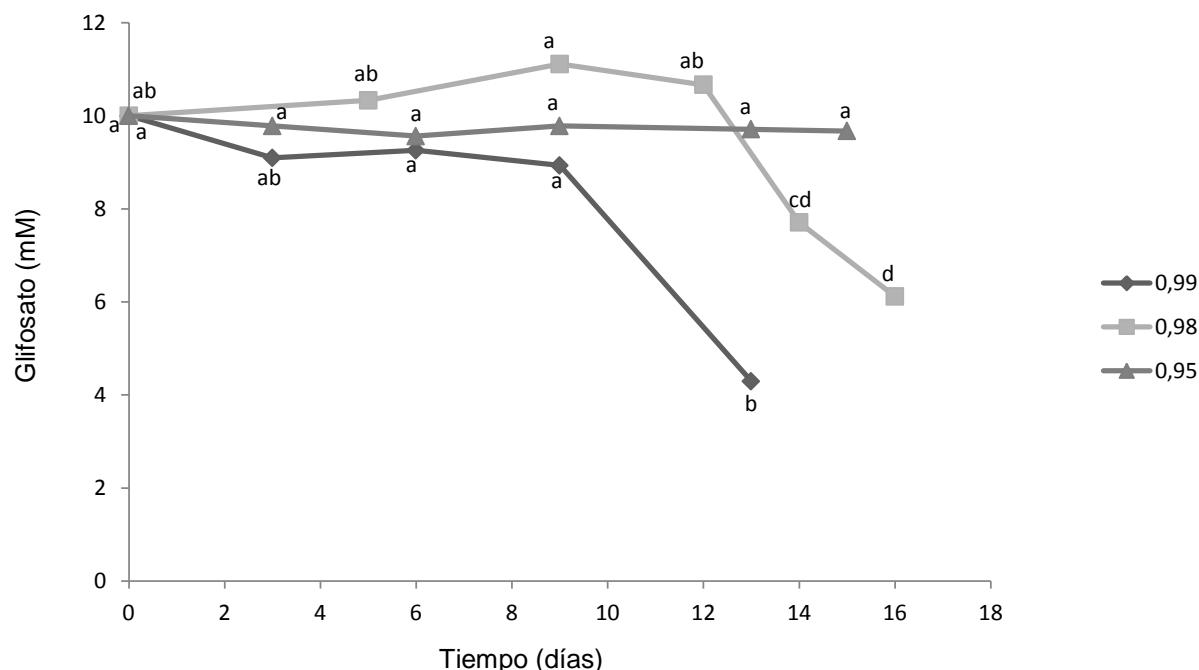
<sup>§</sup> F-Snedecor.

\* Significancia  $p < 0,0001$

### III.V.1.2- Evaluación de la capacidad de utilizar glifosato como única fuente de fósforo en altas concentraciones

Este ensayo se realizó con la finalidad de determinar si la cepa de *A. oryzae* AM1 es capaz de remover altas concentraciones de glifosato (10 mM) *in vitro* como única fuente de fósforo y a tres condiciones de  $a_w$  (0,99, 0,98 y 0,95) (**Figura 27**).

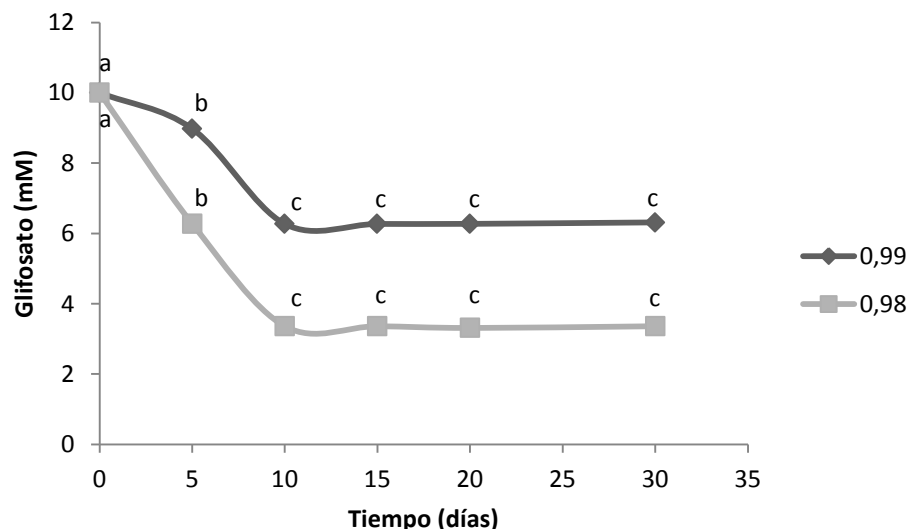
Se registró una disminución significativa del herbicida en el medio de cultivo a 0,99 y 0,98 de  $a_w$  ( $p < 0,05$ ). Los porcentajes de remoción estuvieron alrededor del 57% a 0,99 de  $a_w$  a los 13 días de incubación y de 38% a 0,98 de  $a_w$  a los 16 días. A 0,95 de  $a_w$ , la concentración residual de glifosato se mantuvo constante a lo largo del período de incubación (**Figura 27**).



**Figura 27:** Remoción de glifosato por *A. oryzae* AM1 en caldo Czapeck con glifosato como única fuente de fósforo en altas concentraciones (10 mM) y acondicionado a 0,99, 0,98 y 0,95 de  $a_w$ . Los valores con letras distintas dentro del mismo tratamiento son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al test LSD.

Debido a que a 0,99 y 0,98 de  $a_w$  se observó la mayor remoción de glifosato y ésta comenzó aproximadamente a los 10 días de incubación, se decidió repetir el ensayo a ambas  $a_w$  con 10 mM de herbicida por un tiempo de incubación más prolongado (30 días) (**Figura 28**)

A ambas  $a_w$  ensayadas se observó una remoción significativa del herbicida a partir del día 5 de incubación hasta el día 10 ( $p < 0,0001$ ). Posteriormente, la concentración residual de glifosato en el medio de cultivo se mantuvo constante hasta el final del período de incubación (30 días). Los porcentajes de remoción al día 10 de incubación fueron 37 y 66% a 0,99 y 0,98 de  $a_w$ . Si bien no superan el 70% de remoción, el proceso es rápido considerando la complejidad de la molécula de glifosato.

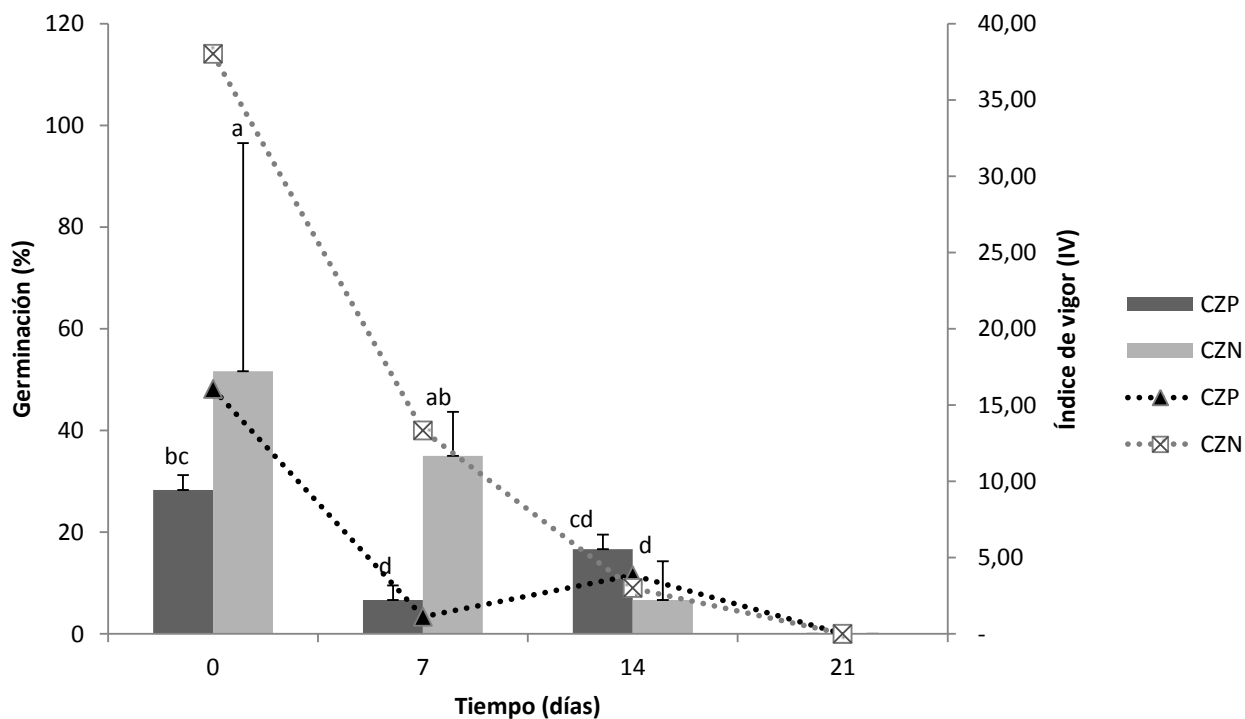


**Figura 28:** Remoción de glifosato por *A. oryzae* AM1 en caldo Czapeck con glifosato como única fuente de fósforo (10 mM). Los valores con letras distintas dentro del mismo tratamiento son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD.

En cuanto a la detección del principal metabolito de degradación de glifosato (AMPA) por HPLC/FD no se logró detectarlo. Mientras que por UPLC MS/MS se detectaron niveles entre 0,006 y 0,009 mM según la muestra analizada.

### III.V.1.3- Evaluación de la fitotoxicidad de los productos de degradación de glifosato por la cepa *A. oryzae* AM1

En la **figura 29** se muestra el porcentaje de germinación de las semillas de lechuga y el índice de vigor (IV) de las plántulas de lechuga germinadas al ser expuestas durante su cultivo a los extractos del ensayo de remoción de glifosato a diferentes tiempos de incubación. El herbicida glifosato demostró ser efectivamente nocivo para las semillas de lechuga ya que tanto el porcentaje de germinación como IV disminuyeron con respecto al control de germinación (agua destilada) de 87 a 30% y de 352 a 20, respectivamente. Con respecto a los tratamientos expuestos a los extractos, se observó que a medida que transcurrieron los días de incubación, los extractos de medio de cultivo resultaron cada vez más nocivos para las semillas ya que los parámetros medidos fueron disminuyendo significativamente con respecto al control ( $p < 0,05$ ). Esto indicaría que durante la degradación del herbicida en el medio de cultivo se forman metabolitos intermediarios, entre ellos AMPA, que resultan igual o mayormente tóxicos que el glifosato por sí solo.



**Figura 29:** Porcentaje de germinación (barras) e índice de vigor (IV) (líneas) de semillas de lechuga cultivadas en extracto de medio de cultivo CZ con glifosato como fuente de fósforo (CZP) y nitrógeno (CZN) del ensayo de remoción con la cepa *A. oryzae* AM1. Los valores medios con letras distintas son significativamente diferentes según el test LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ).

### III.V.2- Evaluación *in vitro* de la remoción de clorpirifós por *A. oryzae* en medio sintético

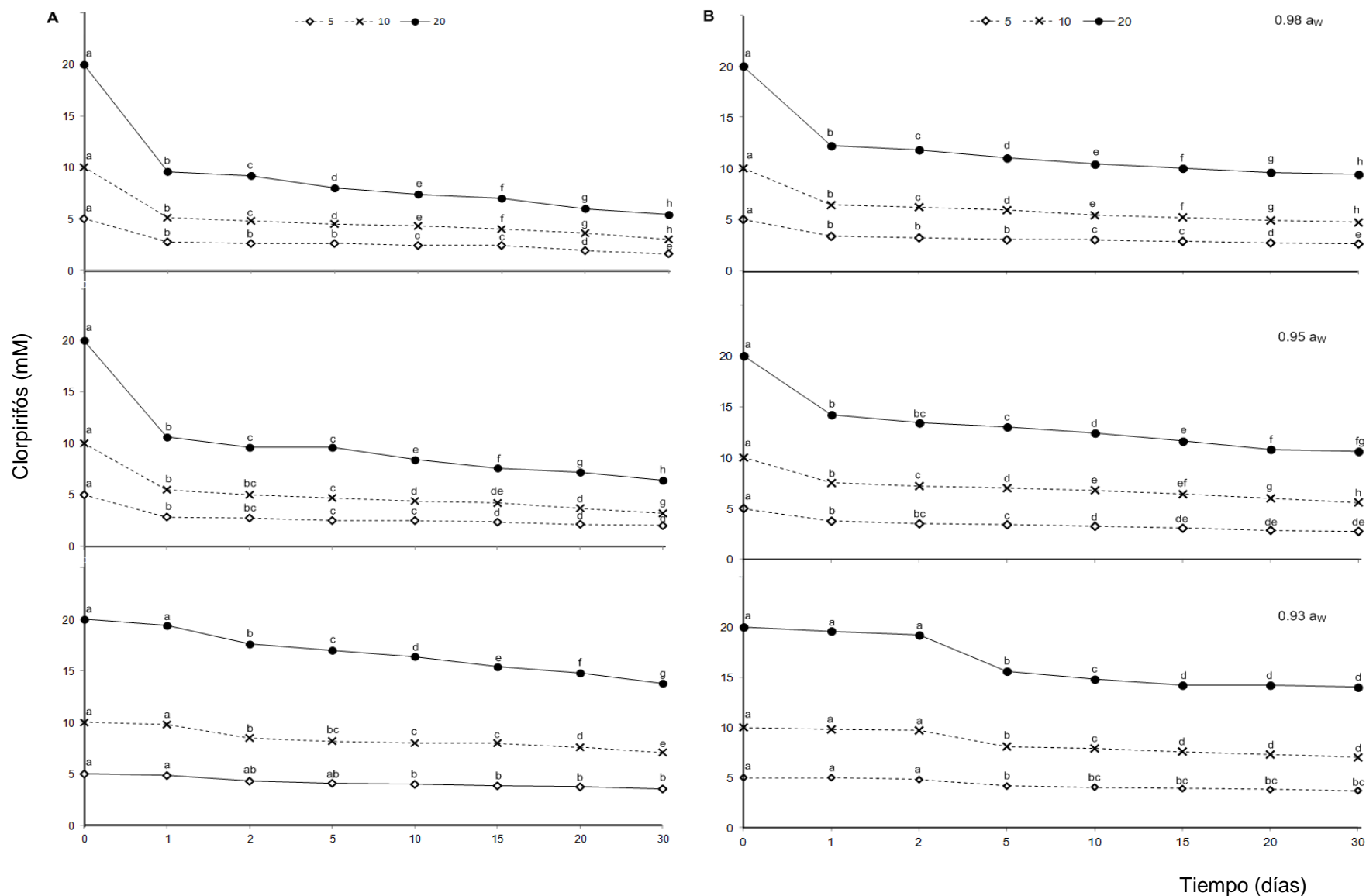
En la **figura 30** se muestra la remoción de clorpirifós por dos cepas de *A. oryzae* (AM1 y AM2) luego de 30 días de incubación a tres condiciones de  $a_w$ . Ambas cepas tuvieron un comportamiento similar en todas las condiciones evaluadas. Como se observa en la figura, en todas las cepas ensayadas la concentración residual de clorpirifós disminuyó desde el primer día de incubación y el porcentaje de degradación observado fue de 75% a 0,98 y 0,95 de  $a_w$  en todas las concentraciones (5, 10 y 20 mM). Mientras que, a 0,93 de  $a_w$ , este porcentaje resultó significativamente menor en todas las concentraciones y cepas ensayadas (<25%).

En general, se observó una rápida disminución de la concentración residual del insecticida en el medio de cultivo dentro de los primeros días de incubación; y posteriormente la velocidad con la que fue disminuyendo la concentración de clorpirifós en el medio de cultivo fue decreciendo con el tiempo ( $p < 0,0001$ ).



El porcentaje de recuperación medio del método fue de  $93 \pm 7,4$  % para los niveles de clorpirifós ensayados.

Cada uno de los factores analizados, por sí solos y la interacción de ellos, influyen significativamente sobre la remoción de clorpirifós en el medio sintético (**Tabla 20**).



**Figura 30:** Remoción de clorpirifós en caldo Czapek (CZ) acondicionado a 0,98; 0,95 y 0,93 de  $a_w$  por cepas de *A. oryzae* AM1 (A) y AM2 (B). Los valores con letras distintas dentro del mismo tratamiento son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test

LSD

**Tabla 20:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de pesticidas (C), diferentes aislados (I) y sus interacciones en los porcentajes de remoción del clorpirifós por cepas de *A. oryzae*.

Fuente de variación	Df <sup>†</sup>	Remoción de clorpirifós	
		MS <sup>‡</sup>	F <sup>§</sup>
I	3	118663.01	10.03*
C	3	17236623.97	1472.62*
$a_w$	2	1266893.00	109.76*
I x C	20	60143.68	5.27*
I x C x $a_w$	102	103999.19	8.62*

<sup>†</sup> Grados de libertad.

<sup>‡</sup> Cuadrado medio.

<sup>§</sup> F-Snedecor.

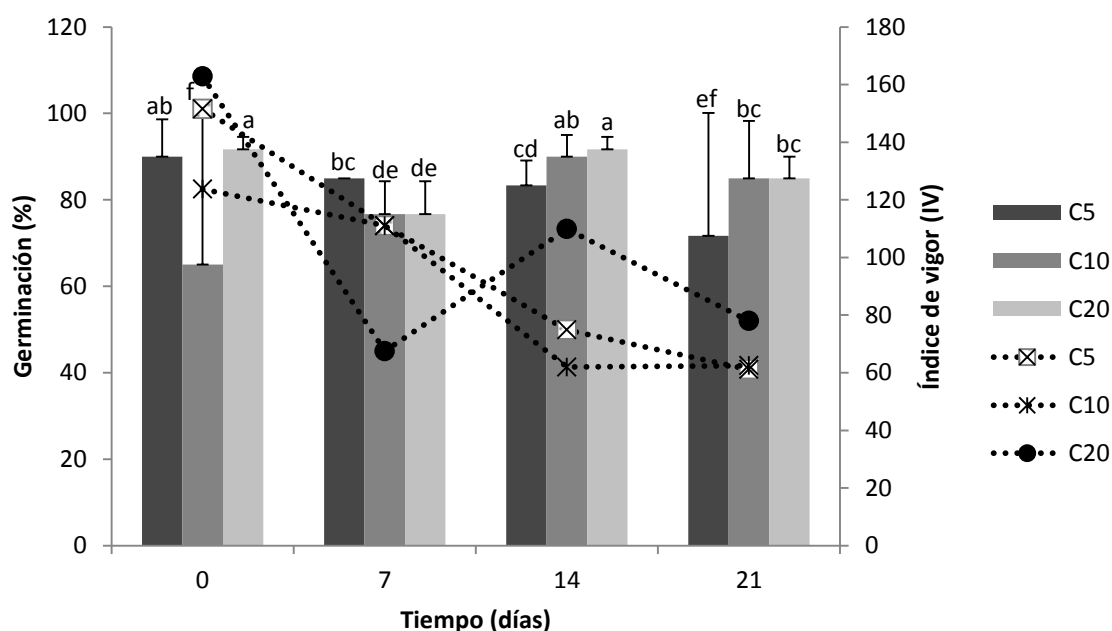
\* Significancia  $p < 0,0001$ .

### III.V.2.1- Evaluación de la fitotoxicidad de los productos de degradación de clorpirifós por la cepa *A. oryzae* AM1

En la **figura 31** se muestra el porcentaje de germinación de las semillas de lechuga y el índice de vigor (IV) de las plántulas de lechuga germinadas al ser expuestas durante su cultivo a los extractos del ensayo de remoción de clorpirifós (5, 10 y 20 mM) a diferentes tiempos de incubación. El insecticida clorpirifós demostró ser nocivo para las semillas de lechuga ya que uno de los parámetros medidos (IV) disminuyó con el respectivo control de germinación (agua destilada) de 296 a 143. Con respecto a los tratamientos expuestos a los extractos, se observó que a las tres concentraciones de clorpirifós ensayadas, a medida que transcurrió el tiempo de incubación, el IV disminuyó con respecto al control. Por el contrario, esto no se observó para el otro parámetro evaluado. Como particularidad, con 5 mM de clorpirifós el porcentaje de germinación disminuyó significativamente al día 21 de incubación

con respecto a los demás periodos ( $p < 0,001$ ). Mientras que con 10 mM de insecticida, a medida que transcurrió el tiempo de incubación el porcentaje de germinación aumentó significativamente.

Esto indicaría que durante la degradación del insecticida en el medio de cultivo se forman metabolitos intermediarios que pueden ser igual o mayormente tóxicos que el clorpirifós por sí solo ya que al menos uno de los parámetros de toxicidad (IV) medidos se vio afectado por los distintos extractos evaluados. Al igual que para el ensayo de fitotoxicidad de glifosato, al parecer esta cepa de *A. oryzae* inicia la degradación de clorpirifós lo cual es importante ya que es el paso clave para lograr posteriormente la mineralización del mismo.



**Figura 31:** Porcentaje de germinación (barras) e índice de vigor (IV) (líneas) de semillas de lechuga cultivadas en extracto de medio de cultivo Czapeck con tres concentraciones de clorpirifós como fuente de carbono (5, 10 y 20 mM) del ensayo de remoción con la cepa *A. oryzae* AM1. Los valores medios con letras distintas son significativamente diferentes según el test LSD de Fisher ( $p < 0,001$ ).

Los hongos filamentosos están siendo cada vez más estudiados en cuanto a su capacidad de degradar pesticidas debido a que poseen ciertas ventajas con respecto a otros microorganismos. Dentro de ellas, el crecimiento en forma de redes miceliales, baja especificidad de sus enzimas catabólicas e independencia en cuanto a la elección del sustrato de crecimiento, pudiendo así utilizar de igual manera un compuesto orgánico o un xenobiótico como los pesticidas (Harms y col. 2011; Chen y col. 2012). Con respecto al glifosato, ambas cepas fueron capaces de remover el herbicida cuando se encontraba tanto

como fuente de fósforo o nitrógeno, y los porcentajes de reducción superaron el 50%. Así como en el caso de la remoción del clorpirifós, la eliminación del glifosato también parece ocurrir rápidamente durante los primeros días de incubación y luego se mantuvo constante. Cuando se ensayaron concentraciones más elevadas de herbicida y diferentes  $a_w$ , se observó que con 10 mM y a condiciones óptimas de  $a_w$  y temperatura la cepa AM1 fue capaz de remover más del 50% del herbicida. Arfarita y col. (2013) evaluaron el crecimiento de una cepa de *Trichoderma viride* en presencia de glifosato como única fuente de fósforo (10 mM). Estos autores observaron que el peso seco del micelio aumentó de manera similar al peso seco observado en el tratamiento sin el herbicida. Además, observaron que el contenido de fósforo del medio de cultivo fue disminuyendo, lo cual indicaría que esta cepa de *T. viride* es capaz de utilizar el herbicida como sustrato de crecimiento. En otro estudio con concentraciones de glifosato de alrededor de 5 mM, observaron que ciertas cepas de *A. flavus*, *P. spiculispurus* y *P. verrucosum* fueron capaces de degradar casi en su totalidad el herbicida del medio de cultivo (porcentajes de degradación de más de 90%) (Eman y col. 2013). Estos resultados difieren de los informados en el presente trabajo ya que los porcentajes de remoción registrados con 10 mM de glifosato fueron menores (más de 50%).

Existe escasa información acerca de la capacidad de degradación de glifosato por cepas de *A. oryzae*. Sin embargo, en estudios realizados en China, Wu y col. (2010) aislaron una cepa de esta especie a partir de lodo de un tanque de aireación de una fábrica de glifosato. Esta cepa fue capaz de degradar un 87% del herbicida (5 mM), lo cual es un valor más elevado que el observado en el presente informe. Este grupo de investigadores continuaron estudiando esta cepa para optimizar las condiciones de producción de enzimas implicadas en la degradación del herbicida en una fermentación estática. Mediante mutagénesis con luz ultravioleta lograron obtener una mayor producción de las enzimas implicadas en la degradación del glifosato con el objetivo de utilizarlas para eliminar residuos del herbicida en semillas de soja transgénicas (Fu y col. 2016). En otro trabajo reciente, Fu y col. (2017) estudiaron la vía metabólica de degradación de este herbicida por esta cepa de *A. oryzae*. Los autores observaron que el glifosato primero es degradado a AMPA el cual es luego transformado en metilamina, y finalmente éste se degrada en otros compuestos. Además, determinaron que la conversión a AMPA es el paso limitante de la reacción y de él depende la velocidad en que el glifosato es biodegradado. En los ensayos de remoción de glifosato realizados se detectó el principal metabolito de degradación AMPA en bajas concentraciones. Esto indicaría que estas cepas de *A. oryzae* (tanto AM1 como AM2) son capaces de degradar el herbicida mediante la vía metabólica que involucra la formación de AMPA y que

probablemente al momento de la detección el AMPA ya comenzó a degradarse en otros metabolitos. Esto explicaría la desaparición de glifosato del medio de cultivo y los niveles bajos de AMPA detectados. Aunque en el presente trabajo no se llegó a estudiar la vía metabólica de degradación de glifosato por la cepa de *A. oryzae* seleccionada, los resultados del ensayo de remoción y la revisión bibliográfica son indicativos de que la misma es capaz de utilizar el herbicida como única fuente de fósforo *in vitro* y promueven el estudio acerca del proceso de degradación y los metabolitos intermediarios que intervienen en el mismo.

En cuanto a los resultados de remoción de clorpirifós en medio sintético, ambas cepas evaluadas fueron capaces de eliminar el 75% del insecticida a 0,98 y 0,95 de  $a_w$ . El proceso de remoción comienza rápidamente, ya que en los primeros días de incubación se alcanzan altos porcentajes de reducción y luego se mantiene constante. Existen muchos estudios acerca de la degradación de este insecticida por diferentes especies tanto bacterianas como fúngicas. Briceño y col. (2012) informaron que dos cepas de *Streptomyces* spp. aisladas de suelo fueron capaces de degradar el 90% del insecticida presente en el medio (25 y 50 mg/L). Xu y col. (2007) demostraron una completa mineralización de dosis bajas de clorpirifós (0,14 mM) por un co-cultivo de bacterias y *Trichosporum* spp. luego de 5 días de incubación. En otro estudio, Kulshrestha y Kumari (2011) informaron una alta degradación (83,9%) de clorpirifós por una cepa de *Acremonium*. Gao y col. (2012) obtuvieron resultados similares con una cepa de *Cladosporium cladosporioides*. Karas y col. (2011) evaluaron la degradación de varios pesticidas (entre ellos clorpirifós) por tres cepas de hongos de la podredumbre blanca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*) y una cepa de *A. niger*. Todas las cepas degradaron el insecticida en un medio a base de suelo y en un medio extracto de paja suplementado con 0,06 mM de clorpirifós. Estos autores registraron una rápida disminución de clorpirifós dentro de los dos primeros días de incubación en todas las cepas ensayadas, lo cual coincide con lo observado en el presente trabajo, a pesar que el porcentaje de degradación alcanzado por las cepas de *A. oryzae* resultó menor que lo informado por los estudios antes mencionados.

Contrariamente a lo registrado en este trabajo, Omar (1998) observó que *A. terreus* tuvo un gran potencial para mineralizar el fósforo orgánico y azufre del clorpirifós en medio líquido seguido por *A. tamari* y *A. niger* entre otras especies fúngicas. Cuando el clorpirifós reemplazó la fuente de fósforo, los porcentajes de degradación fueron 16,7; 6,3 y 3,5% a 0,03; 0,06 y 0,14 mM de clorpirifós respectivamente; y cuando el insecticida reemplazó la fuente de azufre, los porcentajes fueron 56,3; 24,4 y 21,7% respectivamente. En este trabajo,

los porcentajes de remoción observados fueron mayores a los mencionados anteriormente en condiciones óptimas de crecimiento (0,98; 0,95 de  $a_w$  y 25°C), mientras que los valores registrados a 0,93 de  $a_w$  (25%) resultaron comparables. Maya y col. (2012) observaron que cepas de *Aspergillus* fueron capaces de degradar rápidamente tanto el insecticida (62,3 a 92,6%) como el principal metabolito de la degradación del insecticida TCP (69,4 a 89,9%) a concentraciones por encima de 0,6 mM. Estos resultados son comparables con los porcentajes de remoción registrados en el presente estudio.

En un estudio reciente, Yadav y col. (2015) evaluaron la biodegradación aeróbica de clorpirifós por *Aspergillus* spp. en condiciones estáticas y continuas de cultivo en bioreactor. En general, observaron porcentajes de degradación alrededor del 90% en condiciones de cultivo optimizadas (saturación de oxígeno: 5,8 mg/L; nivel de inóculo: 2,5 mg/mL de peso seco; pH: 7; temperatura: 28°C). Estos valores fueron registrados a concentraciones del insecticida hasta 0,8 mM; a mayores concentraciones disminuyó rápidamente. Estos resultados no concuerdan con los informados en este trabajo ya que los porcentajes de remoción que se observaron en este informe fueron menores en las condiciones óptimas de cultivo pero con concentraciones de clorpirifós más elevadas.

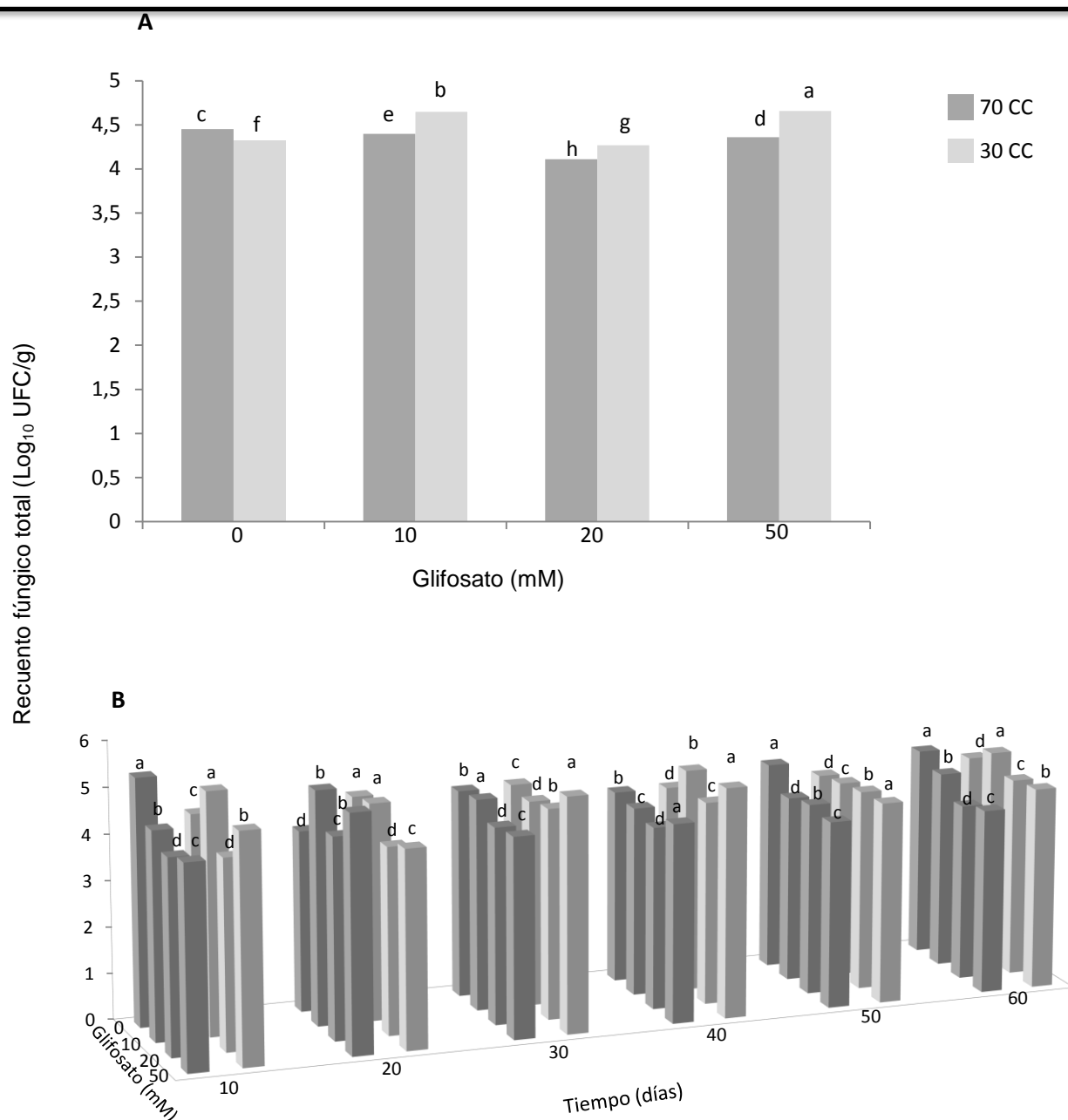
Los resultados obtenidos evidenciaron que durante la remoción de ambos pesticidas no se logró una disminución en la toxicidad del medio de cultivo, lo cual indicaría que hasta los 21 días se generan productos de degradación igualmente tóxicos que el herbicida en sí. En muchos casos, los hongos de suelo son responsables de producir cambios mínimos en la estructura de los pesticidas y otros compuestos recalcitrantes resultando en la liberación de otros productos, los cuales son incorporados y degradados por otros microorganismos de suelo (Gianfreda y Rao 2004). Es por esto que, además de estudiar la degradación de pesticidas por aislados individuales, algunos trabajos remarcen la importancia que poseen los cultivos mixtos de hongos en varias poblaciones donde se evidencia un efecto sinérgico en el catabolismo de los pesticidas (Kulshrestha y Kumari 2011; Knudsen y col. 2013). Estos resultados generan nuevos objetivos para la línea de investigación ya que sería muy importante identificar cuáles son esos metabolitos y evaluar cuáles serían las estrategias a aplicar para lograr reducir tales metabolitos tóxicos mediante la utilización de co-cultivos.

### III.V.3- Evaluación *in situ* de la tolerancia a glifosato y clorpirifós por cepas de *A. oryzae* previamente seleccionadas en presencia de la micobiota nativa

#### III.V.3.1- Evaluación *in situ* de tolerancia a glifosato de la micobiota nativa aislada de suelos destinados al cultivo de soja y maíz

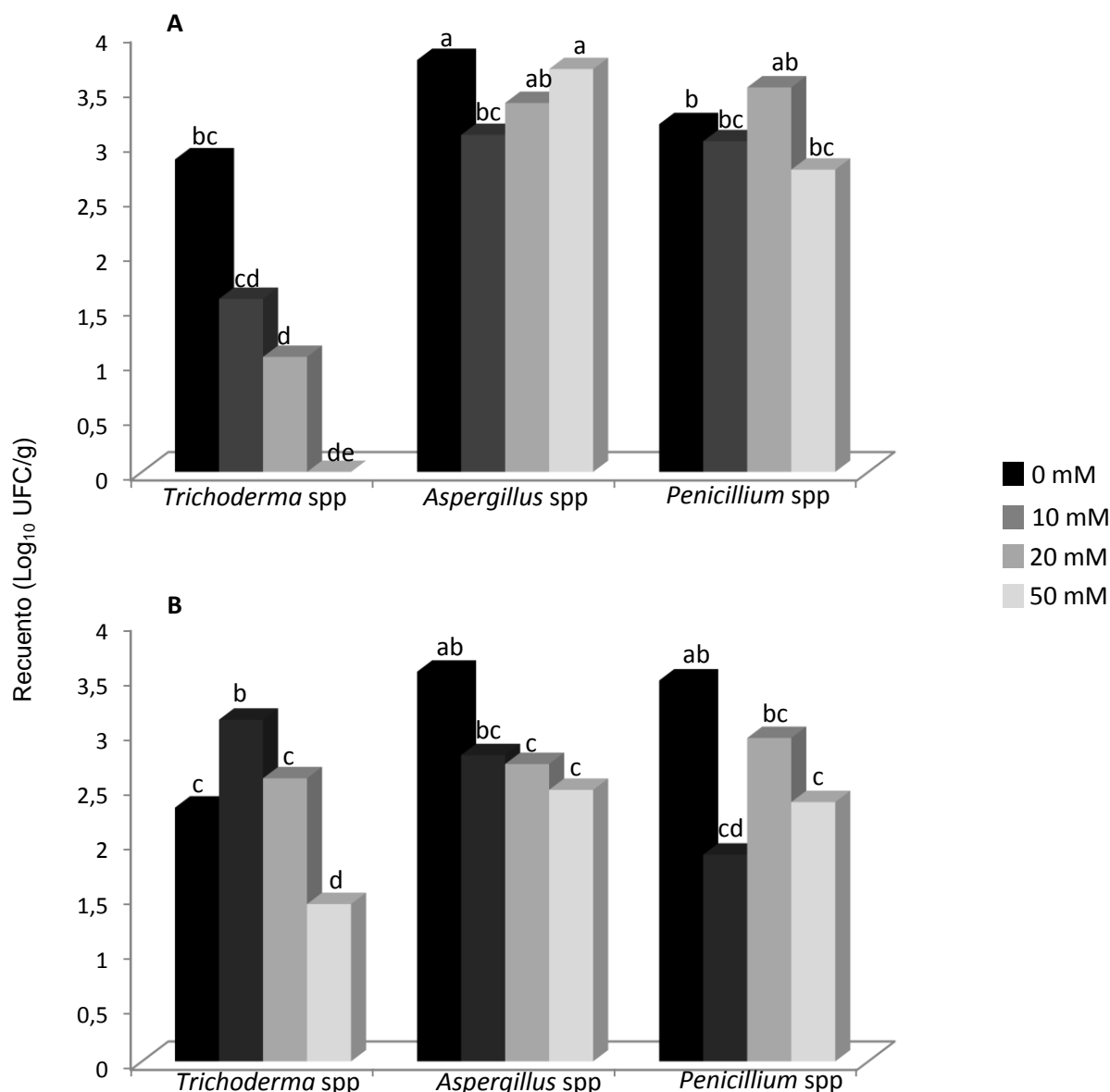
Al analizar el recuento fúngico total se observó que los mismos variaron de acuerdo a la condición de CC analizada. A 70 CC los recuentos fueron significativamente menores en los tratamientos con glifosato comparados al respectivo control. Por el contrario, a 30 CC los recuentos fueron mayores con el agregado de 10 y 50 mM de glifosato (**Figura 32A**). En cuanto al recuento en los distintos períodos muestreados (**Figura 32B**), se pudo observar que dentro de una misma CC y dosis de glifosato evaluada, los recuentos variaron de acuerdo al período analizado. En general a 70 CC, el recuento disminuyó significativamente a medida que aumentó la concentración de herbicida a los 10, 30, 40, 50 y 60 días ( $p < 0,0001$ ). A los 20 y 40 días los mayores recuentos se observaron a 10 y 50 mM ( $5,1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ ) y a 50 mM ( $4,3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ ), respectivamente. A 30 CC, este comportamiento también fue registrado a los 10, 40 y 60 días donde los mayores recuentos fueron observados con 10 y 50 mM. Mientras que a los 30 y 50 días los valores más altos de recuento se observaron con 20 y 50 mM de glifosato.





**Figura 32:** Recuento fúngico total (Log<sub>10</sub> UFC/g) de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC en los ensayos control y con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD. (E.E  $\pm$  0,05)

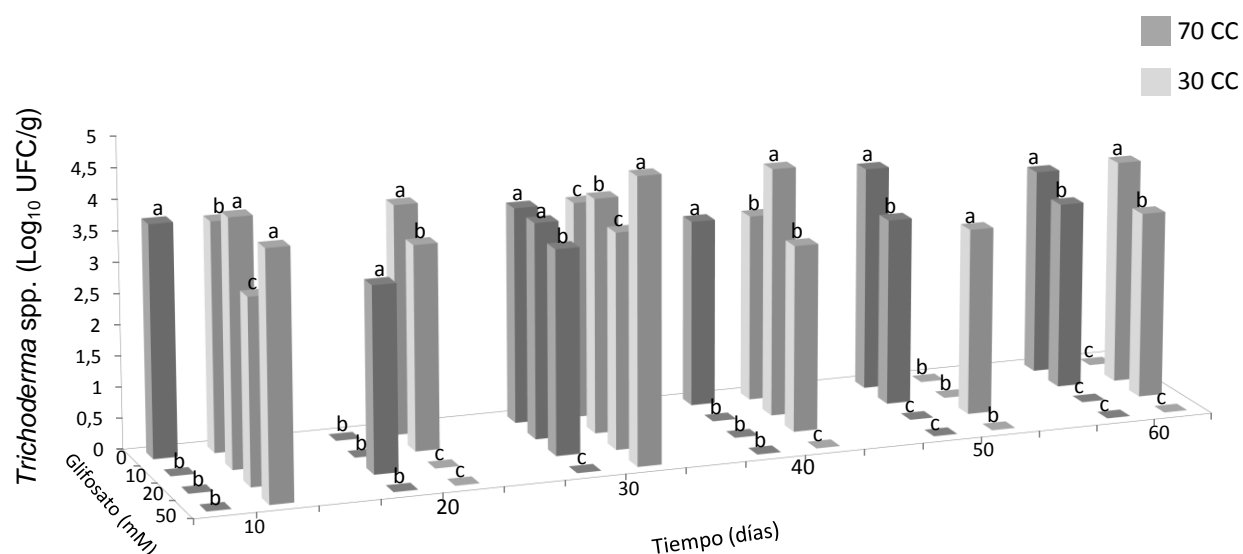
Respecto al análisis de la micobiota nativa de los microcosmos al inicio del experimento (día 1), los géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia fueron *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. tanto a 70 como a 30 CC (**Figura 33**). En general, los recuentos del género *Trichoderma* spp. fueron mayores a 30 CC que a 70 CC; mientras que lo contrario se observó para el género *Aspergillus* spp. Las cepas de *Aspergillus* identificadas como integrantes de la micobiota nativa, no correspondieron a la sección *Flavi*. A 70 CC se observó que el recuento de *Trichoderma* spp. disminuyó significativamente a medida que la concentración de glifosato de los microcosmos aumentó (**Figura 33A**). Esto también fue observado para el género *Aspergillus* spp pero a 30 CC. Los mayores recuentos de *Trichoderma* spp. a 30 CC se observaron con el agregado de 10 y 20 mM de glifosato (**Figura 33B**). Mientras que los mayores recuentos de *Aspergillus* spp. a 70 CC fueron observados en el tratamiento control y con el agregado de 50 mM de glifosato (**Figura 33A**). En general, *Penicillium* spp. tuvo recuentos similares tanto a 70 como a 30 CC. A 70 CC, los valores más altos de recuento se registraron con 20 mM de herbicida (**Figura 33A**). Mientras que a 30 CC, los recuentos de este género disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de pestida en los microcosmos (**Figura 33B**).



**Figura 33:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de los principales géneros fúngicos aislados de los microcosmos al día 1 de incubación acondicionados a 70 (A) y 30 (B) CC y adicionados con diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD. (E.E  $\pm 0,18$  para 70 CC y E.E  $\pm 0,19$  para 30 CC).

Al analizar los recuentos de los géneros fúngicos prevalentes a lo largo del tiempo, se encontró que en general, el recuento del género *Trichoderma* spp. varió de acuerdo al período muestreado (**Figura 34**). Los valores de recuento variaron entre 3 y 4,6 Log<sub>10</sub> UFC/g en todos los tratamientos ensayados. En general, a 70 CC, las especies de este género se

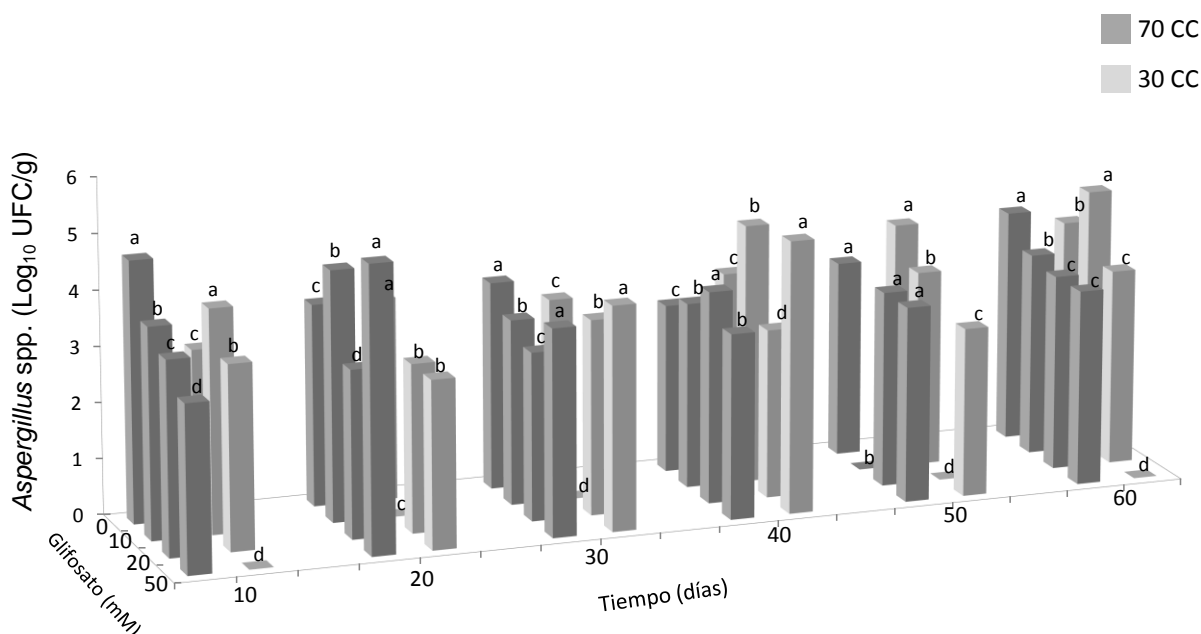
aislaron en los tratamientos controles en los distintos períodos de muestreo. Sólo en algunos períodos se logró aislar a este género en los tratamientos con glifosato. A los 30, 50 y 60 días se aisló *Trichoderma* spp. de los microcosmos adicionados con 10 mM de glifosato; mientras que a los 20 días se logró aislar especies de este género sólo con 20 mM de herbicida. A 30 CC, en los primeros 40 días en general se aisló este género tanto en el control como en los distintos tratamientos con glifosato, siendo los recuentos en los tratamientos en algunos casos significativamente mayores que el recuento observado en el respectivo control ( $p < 0,0001$ ). A los 50 y 60 días de incubación, se observó que en general este género se aisló en los microcosmos adicionados con las concentraciones más bajas de glifosato (10 y 20 mM).



**Figura 34:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *Trichoderma* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC y con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD ( $E.E \pm 0,25$ ).

En cuanto a *Aspergillus* spp., se aislaron especies de este género tanto en los tratamientos controles como en los tratamientos con glifosato a ambas CC. Los valores de recuento en todos los tratamientos variaron entre 3 y 5,2  $\text{Log}_{10}$  UFC/g a lo largo del período de incubación. Con respecto a los microcosmos adicionados con el herbicida, el recuento de este género fúngico varió de acuerdo al período y condición de CC analizado. A 70 CC, los valores de recuento de *Aspergillus* spp. observados disminuyeron significativamente a

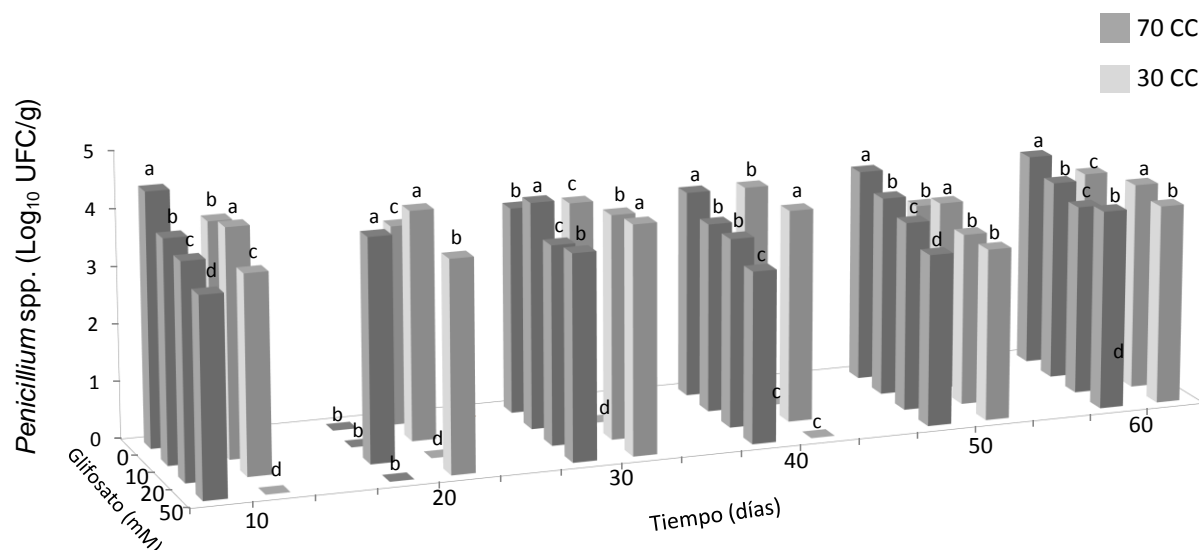
medida que aumentaba la concentración de glifosato sólo a los 10 y 60 días de incubación ( $p < 0,0001$ ). Mientras que, en general, en los demás períodos muestreados los recuentos de este género en los microcosmos adicionados con 50 mM de glifosato fueron mayores o iguales al observado en el respectivo control. A los 20 y 50 días, también se registró un aumento significativo en el recuento de las especies pertenecientes al género *Aspergillus* spp. con el agregado de 20 mM de herbicida. En cuanto a la condición de 30 CC, los recuentos también disminuyeron significativamente a medida que aumentó la concentración de glifosato pero a los 20 y 50 días de incubación. A los 10 y 60 días los recuentos más elevados se observaron con 10 mM de herbicida, mientras que a los 30 y 40 días, en general los mayores valores se registraron con 50 mM de glifosato (**Figura 35**).



**Figura 35:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *Aspergillus* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD ( $E.E \pm 0,19$ ).

La **figura 36** muestra el recuento del género *Penicillium* spp. a lo largo del período de incubación. Los recuentos de este género mostraron, en general, un comportamiento más uniforme con respecto a los recuentos de los géneros *Trichoderma* spp. y *Aspergillus* spp. Los valores de recuento variaron entre a 3 y 4,4  $\text{Log}_{10}$  UFC/g. A 70 CC se observó que los valores de recuento de las especies del género *Penicillium* spp. disminuyeron significativamente a medida que se incrementó la concentración de glifosato ( $p < 0,0001$ ). Por

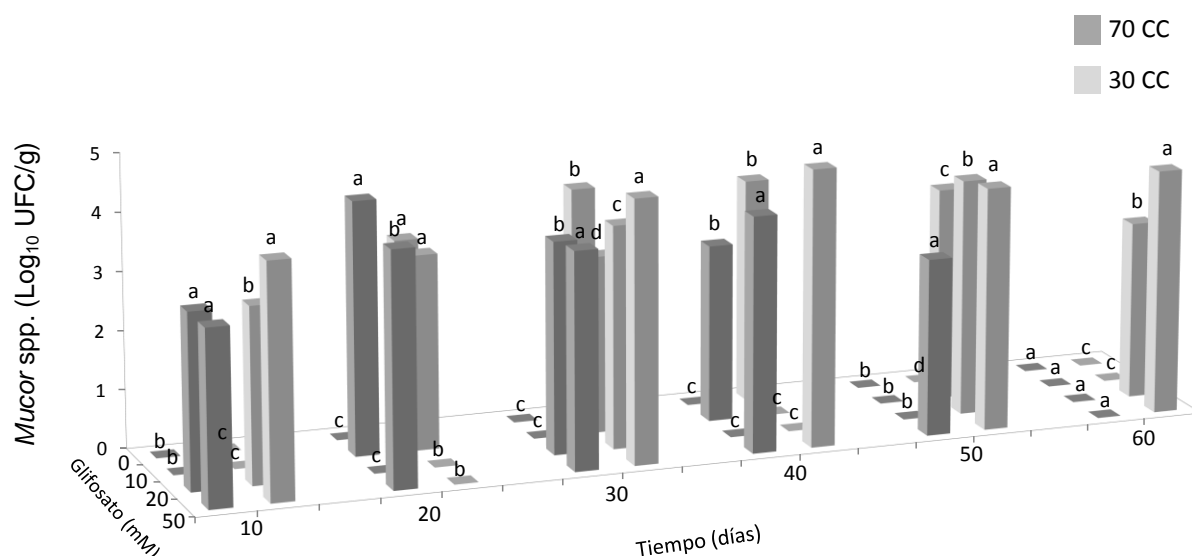
el contrario a 30 CC, en general los recuentos más altos se registraron en los tratamientos con el herbicida. A los 10, 20 y 50 días los valores más elevados se observaron en el tratamiento con 10 mM de glifosato; mientras que a los 30 y 60 días el mayor recuento se registró en los tratamientos con 50 y 20 mM respectivamente.



**Figura 36:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *Penicillium* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD ( $E.E \pm 0,20$ ).

Otro género fúngico aislado, aunque con menor frecuencia que los demás géneros ya descritos, fue *Mucor* spp. En términos generales, los recuentos observados a 30 CC fueron mayores que los registrados a 70 CC, con excepción de los valores obtenidos a los 20 días de incubación. En los tratamientos con concentraciones elevadas de glifosato (50 mM), en la mayoría de los períodos muestreados, fue donde se observaron los valores más altos de recuento (3 a 4,7 Log<sub>10</sub> UFC/g) comparados con el resto de los tratamientos (3 a 4,3 Log<sub>10</sub> UFC/g). A 70 CC y a los 10 y 30 días de incubación, los recuentos más altos de las especies de *Mucor* spp. aisladas se observaron con 50 y 20 mM de glifosato. Mientras que a los 20 y 40 días, los mayores recuentos se registraron con 50 y 10 mM de herbicida. En los últimos días de incubación (50 y 60 días), este género prácticamente no fue detectado. En cuanto a lo observado a 30 CC, las especies del género *Mucor* spp. se aislaron en todos los períodos muestreados y su comportamiento en los tratamientos ensayados resultó muy variable. Con excepción del día 20 de incubación, en general el recuento resultó significativamente mayor

con 50 mM de glifosato con respecto al control y a los demás tratamientos con herbicida ( $p<0,0001$ ) (**Figura 37**).



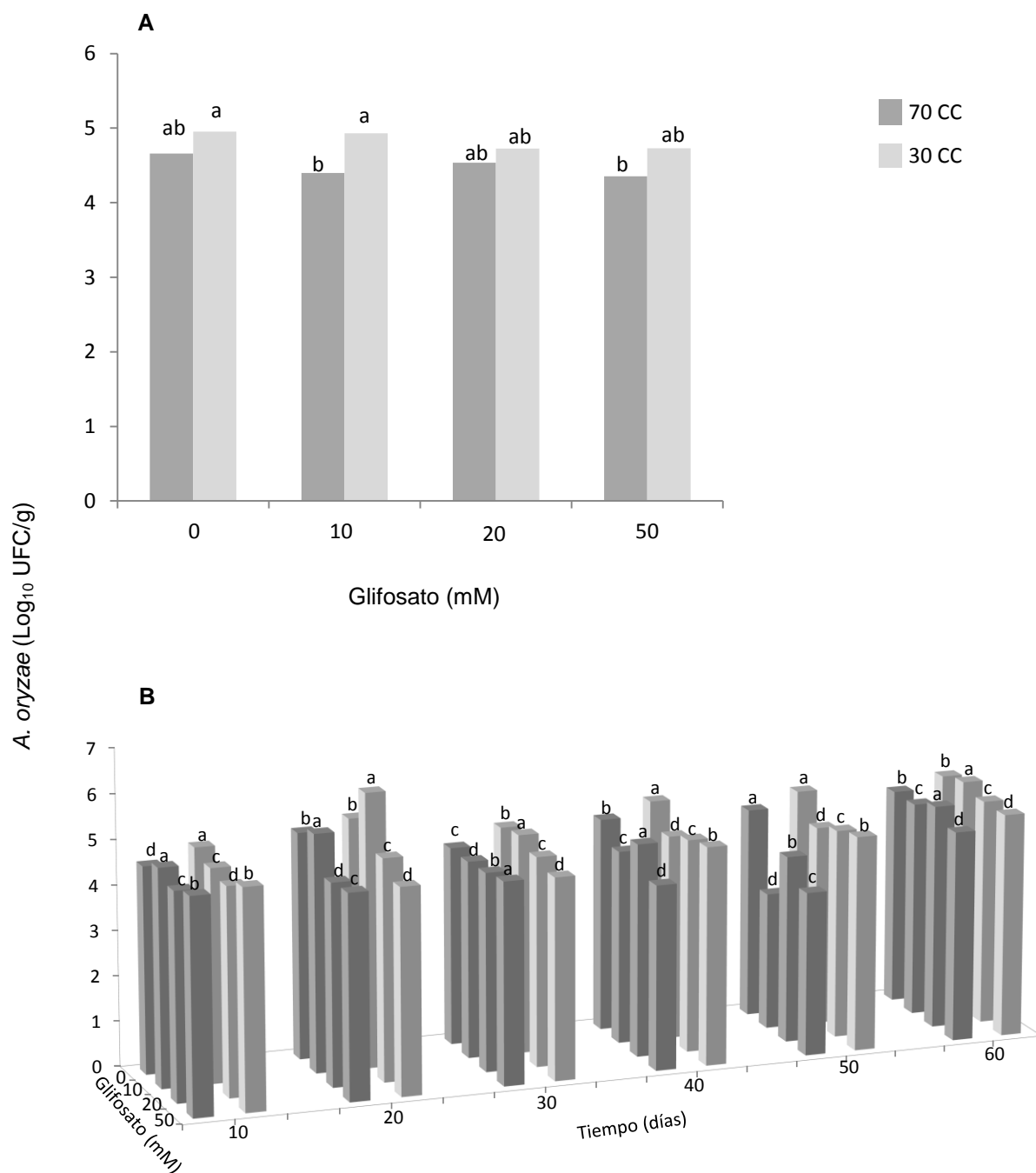
**Figura 37:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *Mucor* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p<0,0001$ ) de acuerdo al test LSD ( $E.E \pm 0,27$ ).

#### III.V.3.1.1- Evaluación *in situ* de la tolerancia a glifosato por *A. oryzae* AM1, en presencia de la micobiota nativa

La **figura 38** muestra los recuentos de la cepa *A. oryzae* AM1 en los microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC y con el agregado de tres concentraciones de glifosato. En general los recuentos de esta cepa resultaron significativamente menores a 70 CC que a 30 CC sin diferencia significativas entre los controles y los tratamientos con el herbicida a ambas CC ( $p<0,0001$ ) (**Figura 38A**). A lo largo del período de incubación se observó que esta cepa se aisló de todos los tratamientos (**Figura 38B**). En general no se registró una disminución notable de los recuentos con el aumento de la concentración de glifosato a ambas CC, ya que se observaron recuentos más elevados con ciertas concentraciones del herbicida comparados con los valores registrados en los respectivos controles. A 70 CC, por ejemplo, a los 10 y 20 días de incubación se observó el mayor recuento con 10 mM de glifosato. Mientras que a los 40 y 60 días el valor más alto se registró con 20 mM de herbicida. A 30 CC y a los 10, 40 y 50 días de incubación se observó el mayor recuento en el tratamiento control, seguido por el tratamiento con 50 mM de glifosato. En cambio a los 20,

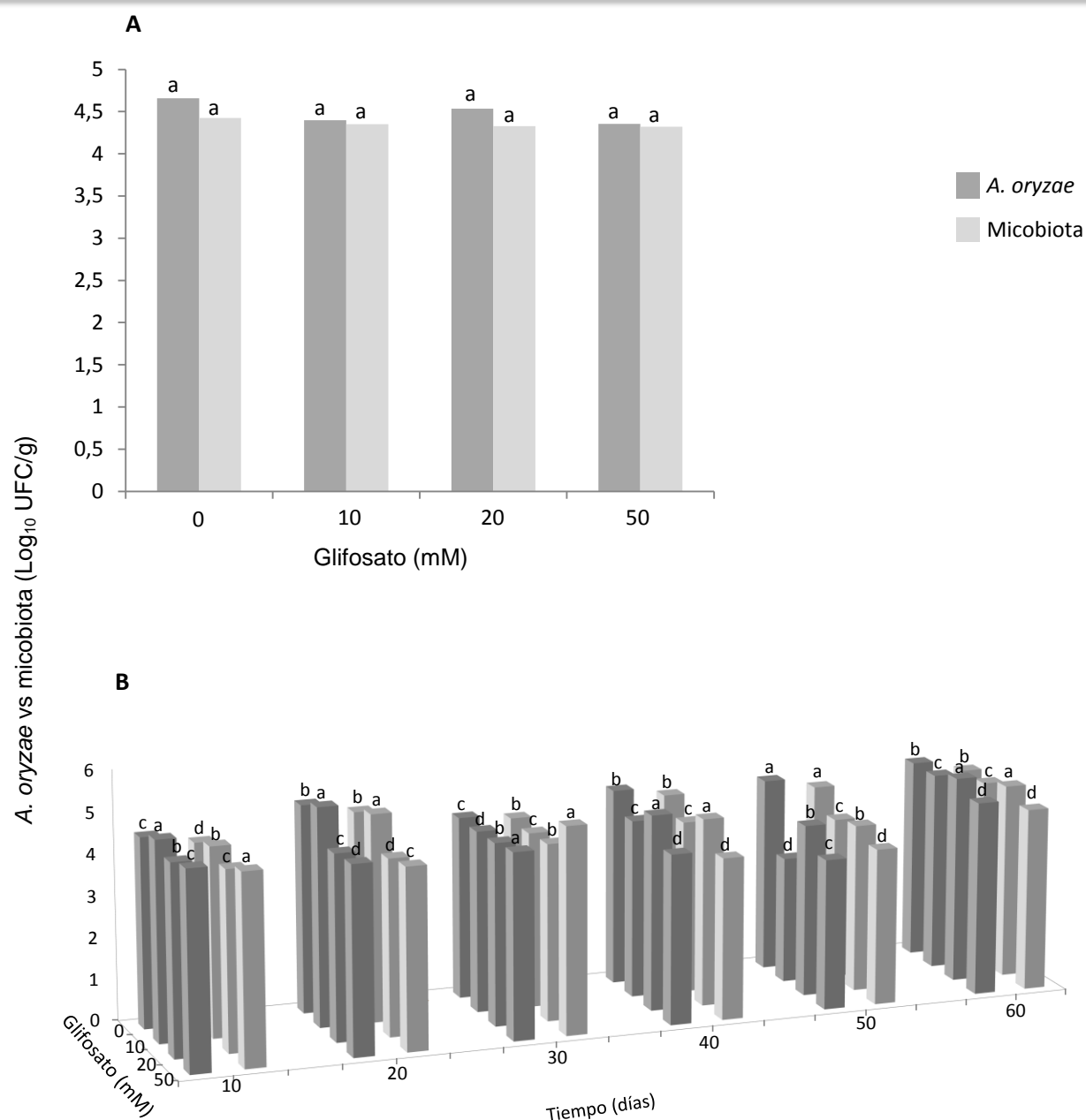
30 y 60 días, se observó un aumento significativo del recuento de la cepa AM1 con el agregado de 10 mM de glifosato con respecto al control ( $p < 0,0001$ ).





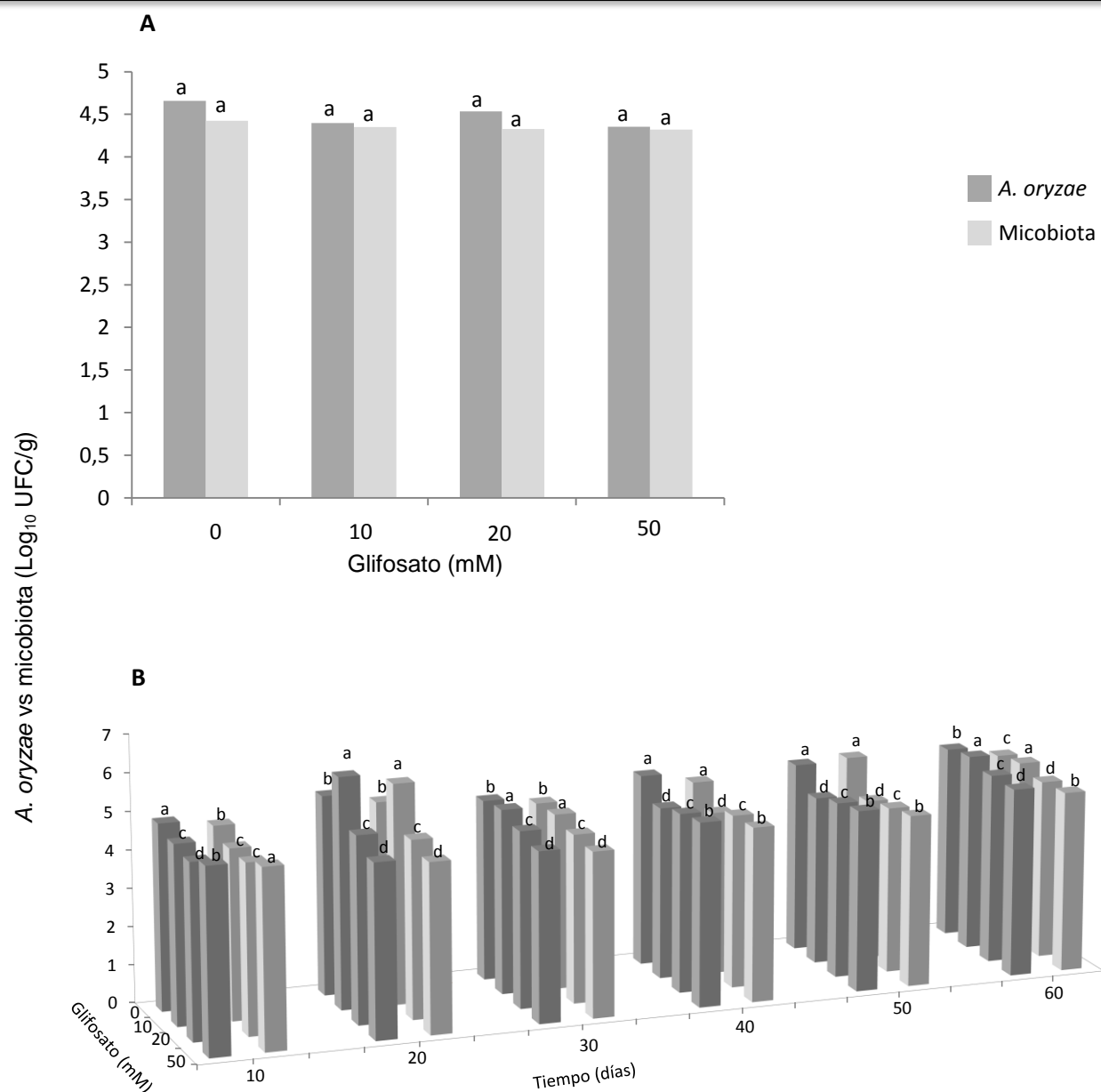
**Figura 38:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *A. oryzae* AM1 aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,06$ ).

Al analizar el comportamiento de la cepa de *A. oryzae* en presencia de la micobiota nativa, se observó que la misma fue capaz de tolerar las diferentes dosis del herbicida evaluado tanto a 70 como a 30 CC (**Figura 39 y 40**). A 70 CC, en general el recuento de *A. oryzae* en los tratamientos con glifosato fue similar o mayor con respecto al recuento en el tratamiento control a lo largo del periodo de incubación (**Figura 39A**). En la mayoría de los períodos muestreados los valores más altos de recuento se registraron en alguno de los tratamientos con el herbicida. Sólo a los 50 días de incubación el mayor recuento se registró en el tratamiento control (**Figura 39B**).



**Figura 39:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *A. oryzae* AM1 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 70 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,06$ )

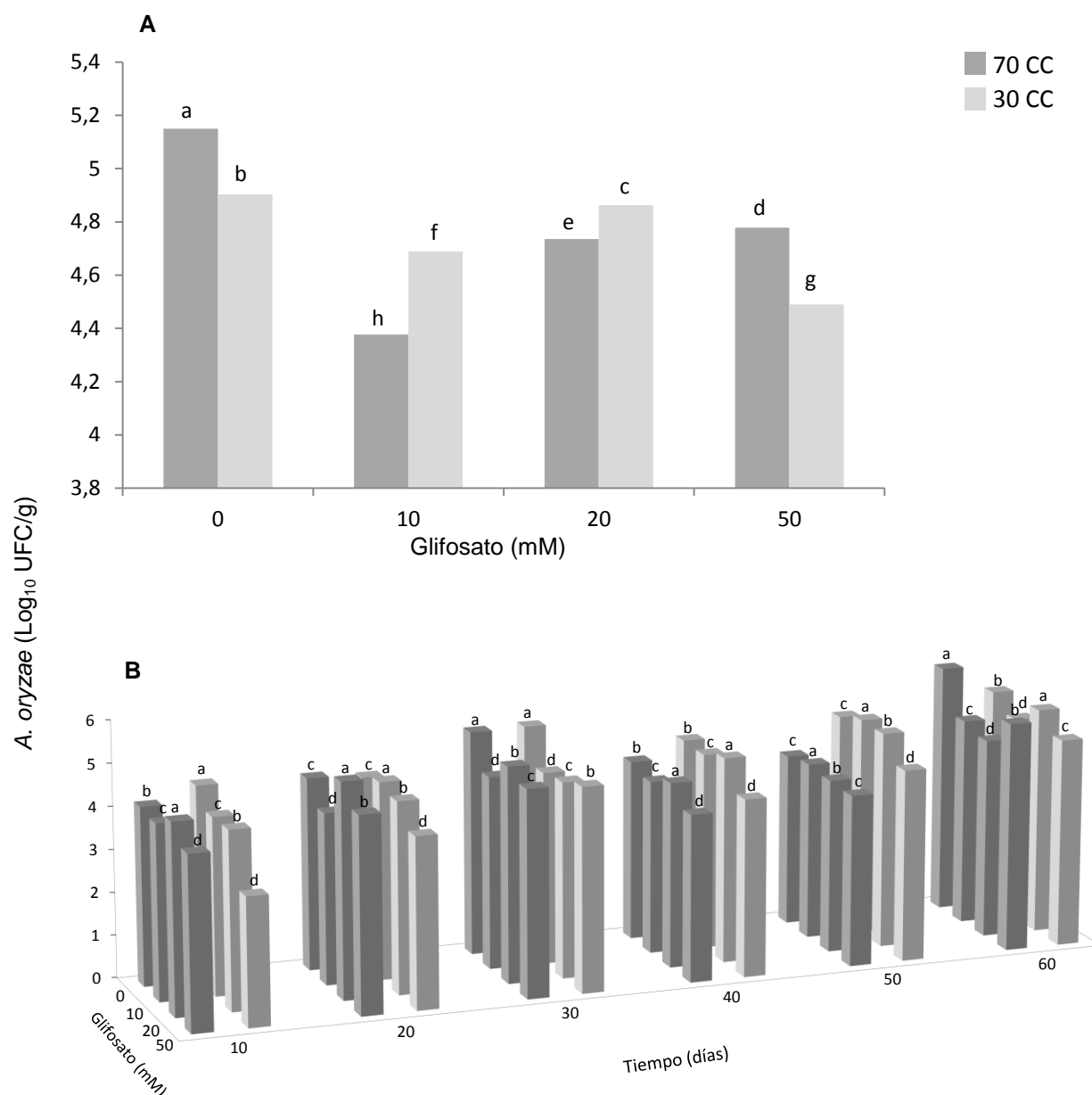
En la condición de 30 CC, tanto la cepa de *A. oryzae* como la micobiota nativa mostraron un comportamiento similar (**Figura 40A**). En general, a los 10, 40 y 50 días de incubación los mayores valores de recuento se observaron en el tratamiento control. Mientras que, a los 20, 30 y 60 días se registraron los valores más altos de recuento con 10 mM de glifosato. Como particularidad, en algunos períodos muestreados se observó que el recuento aumentó en los microcosmos con 50 mM de glifosato con respecto a las demás concentraciones ensayadas (**Figura 40B**).



**Figura 40:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *A. oryzae* AM1 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD ( $E.E. \pm 0,05$ )

#### III.V.4.2.1- Evaluación *in situ* de la tolerancia a glifosato por *A. oryzae* AM2, en presencia de la micobiota nativa

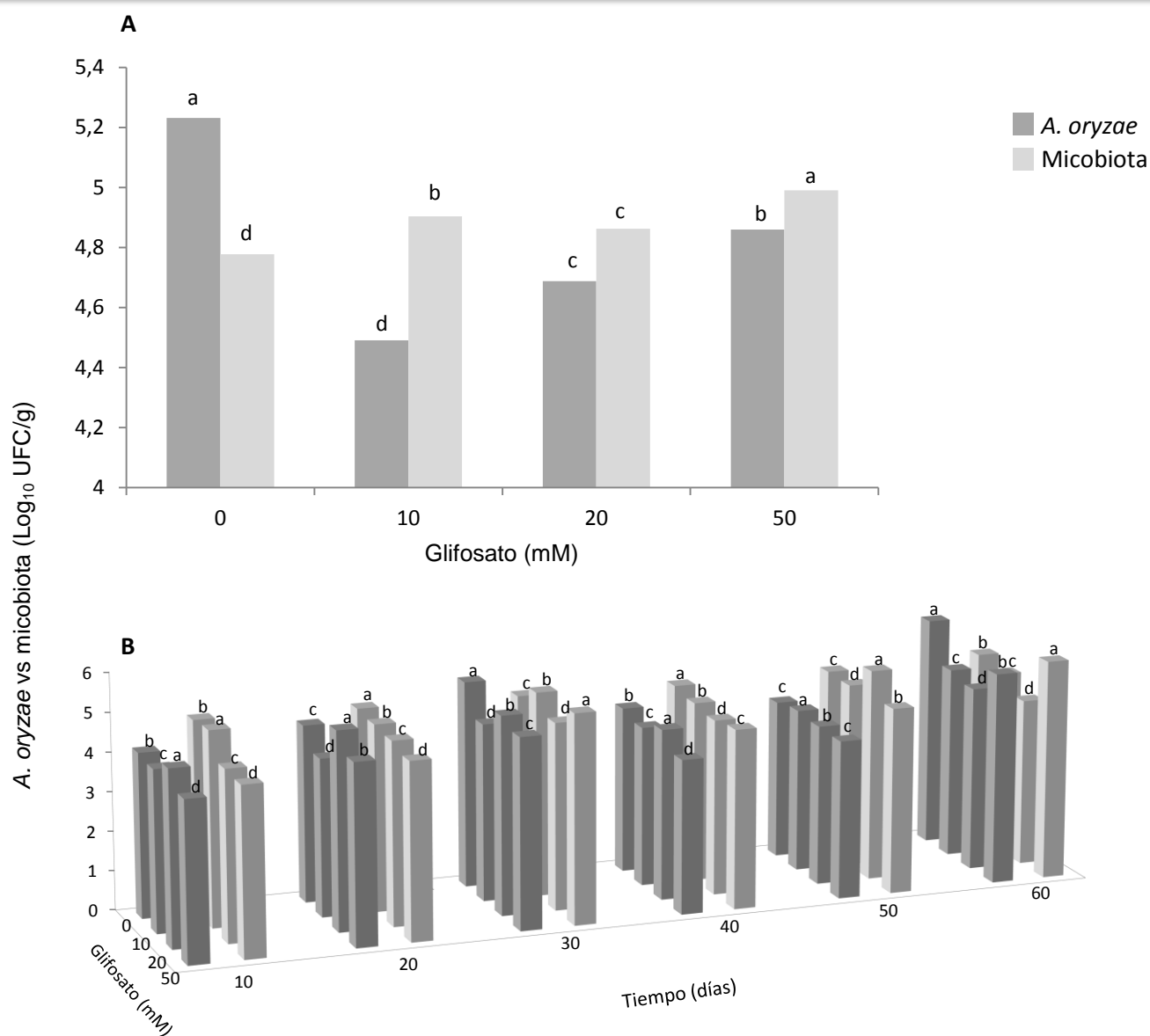
En la **figura 41** se muestra el recuento de la cepa *A. oryzae* AM2 de los microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC y adicionados con tres concentraciones de glifosato. En general, los valores más elevados de recuento se observaron en el tratamiento control a ambas CC ensayadas (**Figura 41A**). A lo largo del período de incubación se observó que esta cepa se aisló de todos los tratamientos (**Figura 41B**). En general no se registró una disminución notable de los recuentos con el aumento de la concentración de glifosato a ambas CC, ya que se observaron recuentos más elevados con ciertas concentraciones del herbicida comparados con los valores registrados en los respectivos controles. A 70 CC, el recuento de *A. oryzae* aumentó significativamente con el agregado de 20 mM de glifosato a los 10, 20 y 40 días de incubación ( $p < 0,0001$ ). Mientras que a 30 CC lo mismo se observó pero con 10 mM de herbicida a los 20 y 50 días y con 20 mM de glifosato a los 40 y 60 días de incubación. Como particularidad, a los 10 y 30 días, en general el recuento de la cepa AM2 disminuyó significativamente a medida que aumentó la concentración de glifosato (**Figura 41B**).



**Figura 41:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *A. oryzae* AM2 de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,07$ ).

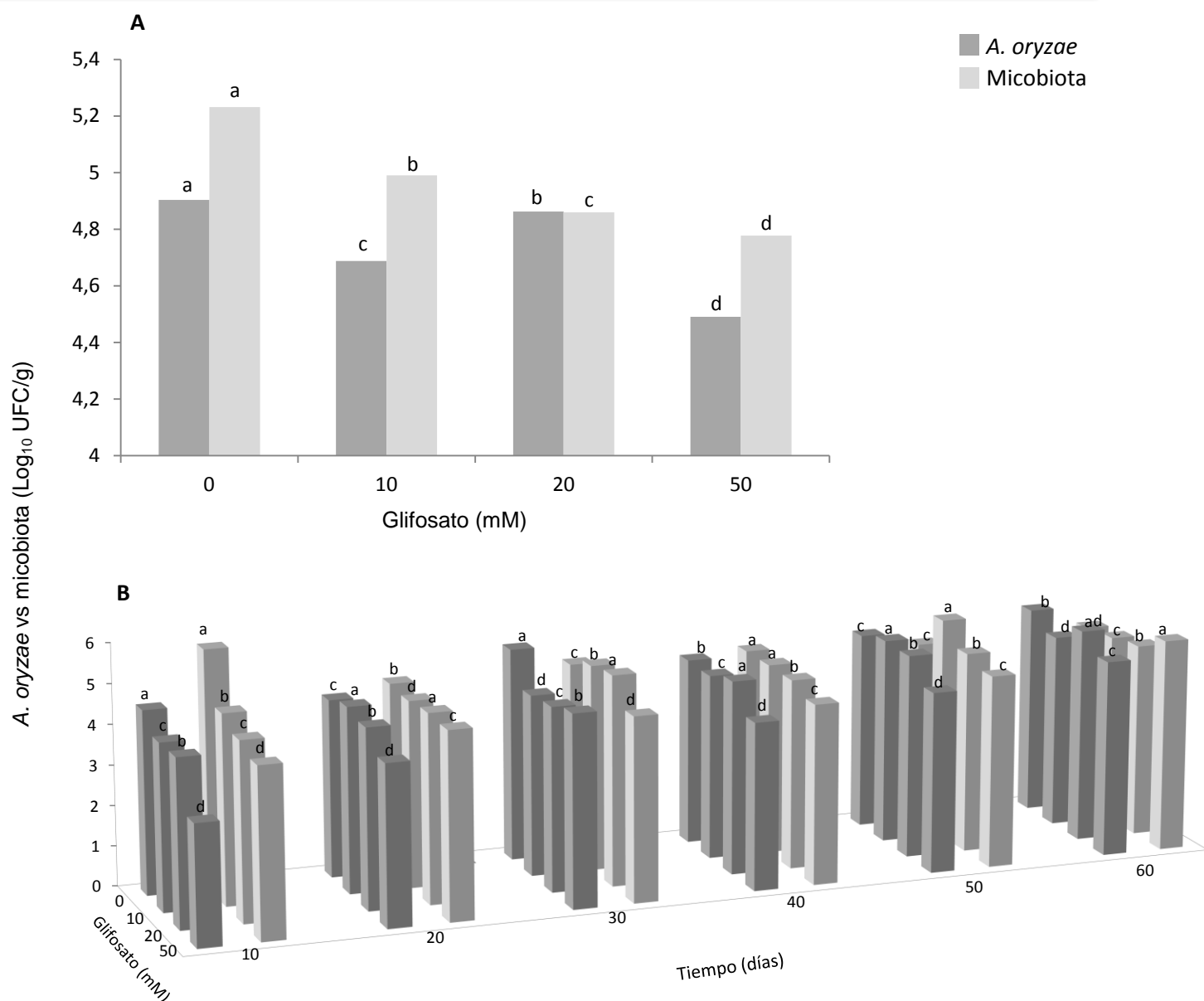
Al analizar los recuentos de la cepa *A.oryzae* AM2 en presencia de la micobiota nativa, se observó que la misma fue capaz de tolerar las diferentes concentraciones de glifosato a ambas CC ensayadas (**Figura 42 y 43**). A 70 CC, el recuento de *A. oryzae* fue significativamente menor en los microcosmos adicionados con el herbicida con respecto al control ( $p<0,0001$ ). Mientras que la micobiota tuvo los valores más elevados de recuento en los tratamientos con glifosato (**Figura 42A**). Con respecto a los diferentes períodos muestreados, se observó que en los microcosmos con 20 mM de glifosato el recuento de la cepa AM2 fue significativamente mayor con respecto al control a los 10, 20 y 40 días de incubación (**Figura 42B**). Los valores medios de recuento de *A. oryzae* AM2 variaron entre 4,7 y 5,2 Log<sub>10</sub> UFC/g en todos los tratamientos.





**Figura 42:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *A. oryzae* AM2 y la microbiota nativa de microcosmos acondicionados a 70 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD ( $\text{E.E.} \pm 0,06$ )

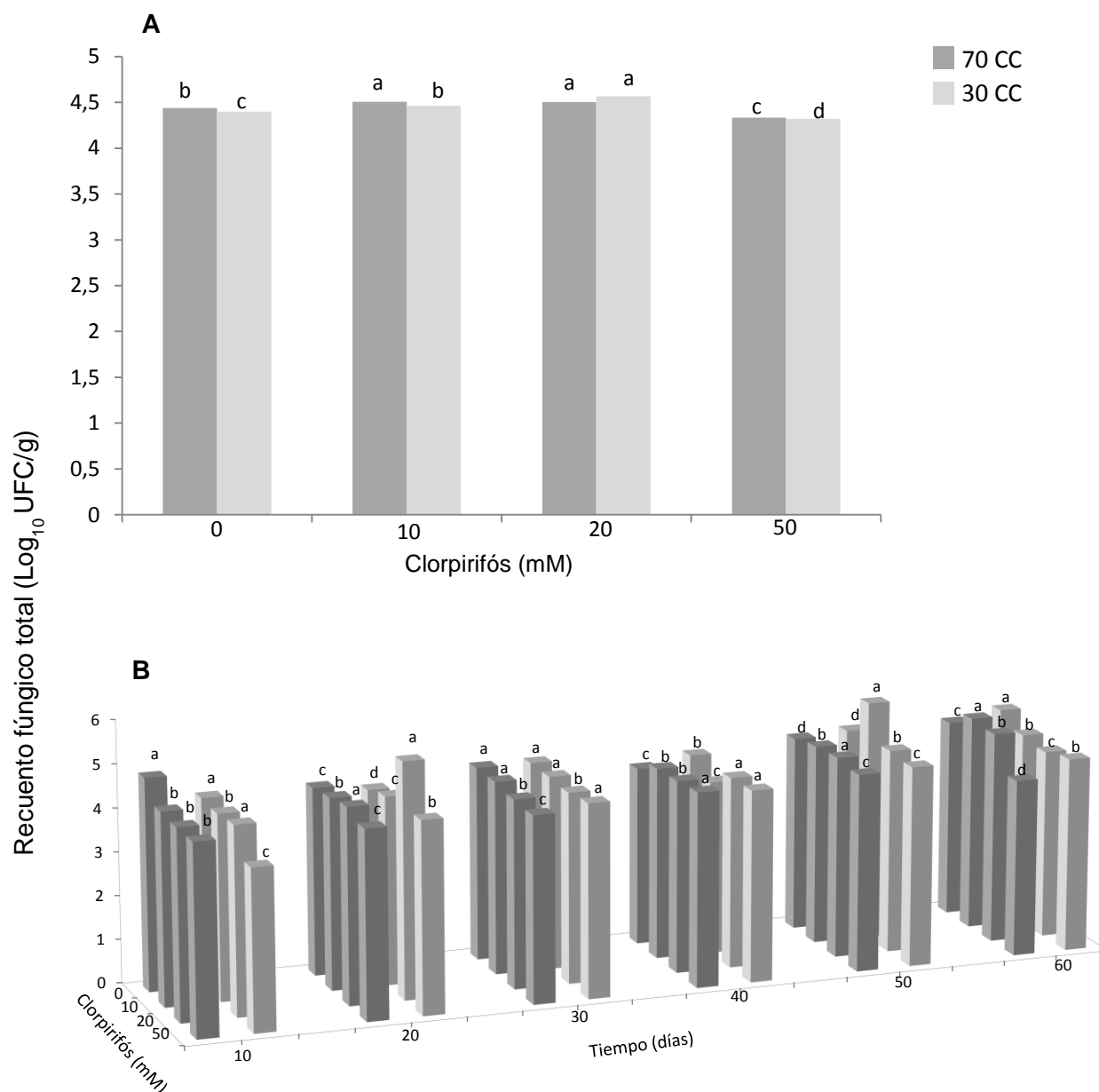
A 30 CC, al igual que a 70 CC, los recuentos de la cepa *A. oryzae* AM2 también disminuyeron significativamente a medida que aumentó la concentración de glifosato ( $p < 0,0001$ ). Mientras que por el contrario a lo observado a 70 CC, a 30 CC los recuentos de la micobiota disminuyeron significativamente con el sucesivo aumento de la concentración de herbicida (**Figura 43A**). Al analizar los distintos períodos muestreados, se observó que el recuento de *A. oryzae* aumentó significativamente con el agregado de 10 mM de glifosato a los 20 y 50 días de incubación (**Figura 43B**). Lo mismo se observó a los 40 y 60 días de incubación pero con 20 mM de glifosato.



**Figura 43:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *A. oryzae* AM2 y la micobiota nativa de microcosmos acondicionados a 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,06$ ).

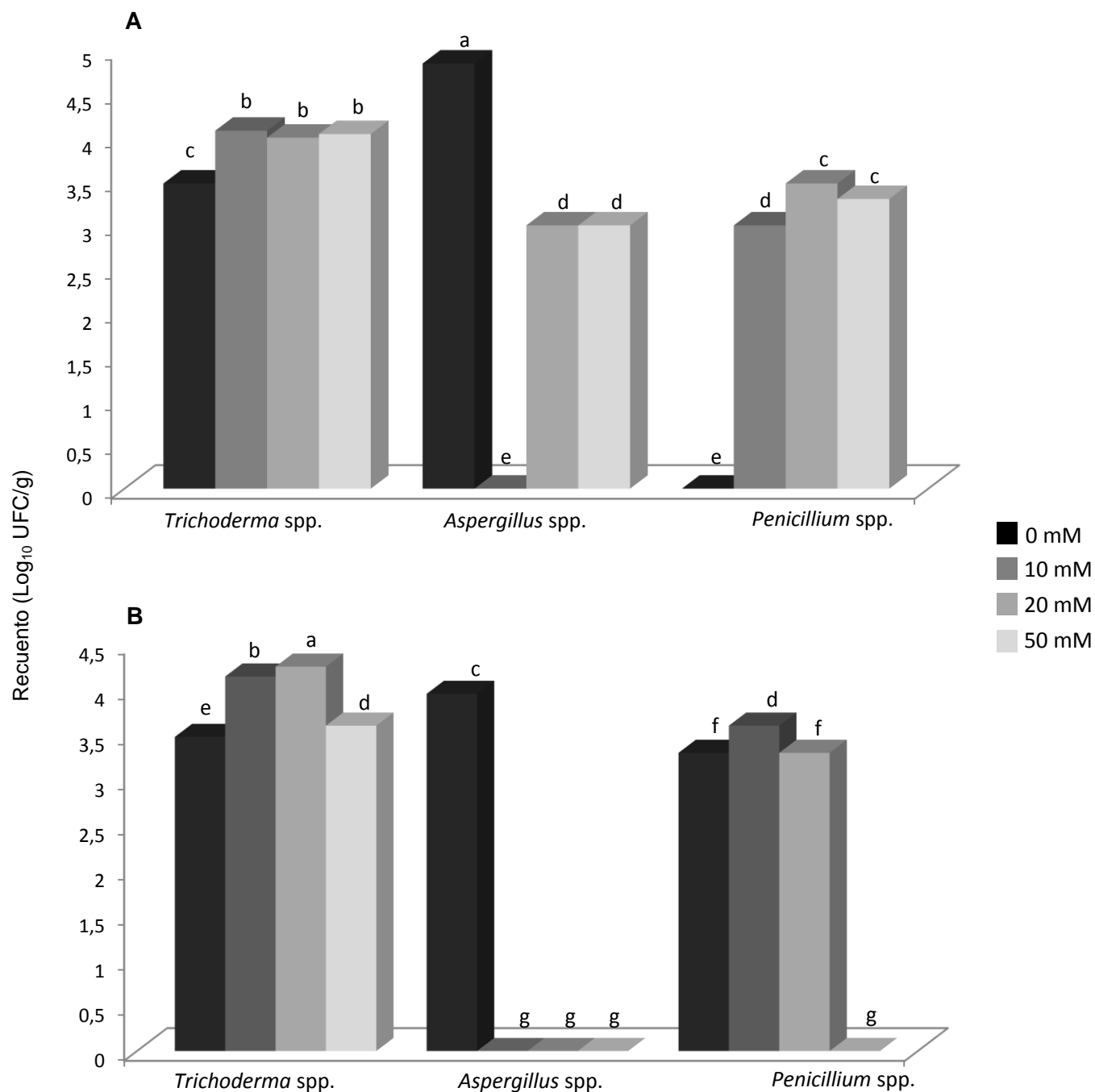
### III.V.3.2- Evaluación *in situ* de tolerancia a clorpirifós de la micobiota nativa aislada de suelos destinados al cultivo de soja y maíz

Al analizar el recuento fúngico total se pudo observar que, a ambas condiciones de CC, éste aumentó significativamente con el agregado de 10 y 20 mM del insecticida en relación al control correspondiente, mientras que con la concentración más elevada de clorpirifós se observaron valores inferiores para ambas CC con respecto al control ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 44A**). Al analizar el recuento fúngico total en los distintos períodos de muestreo (**Figura 44B**) se pudo observar que dentro de una misma CC y dosis de clorpirifós evaluada, los recuentos variaron según el período analizado. A 70 CC y con 10 y 20 mM los recuentos resultaron significativamente superiores a los 60 días en comparación con los primeros períodos de muestreo, mientras que con la mayor concentración utilizada (50 mM) los recuentos a los 60 días fueron significativamente inferiores a los detectados en los muestreos anteriores. Este comportamiento no se observó a 30 CC, en donde los recuentos fueron menos homogéneos en cada período de incubación considerado. Los recuentos más elevados (5,5 y 5,4  $\text{Log}_{10}$  UFC/g) se obtuvieron con 10 y 20 mM de clorpirifós a los 50 y 20 días de incubación, respectivamente.



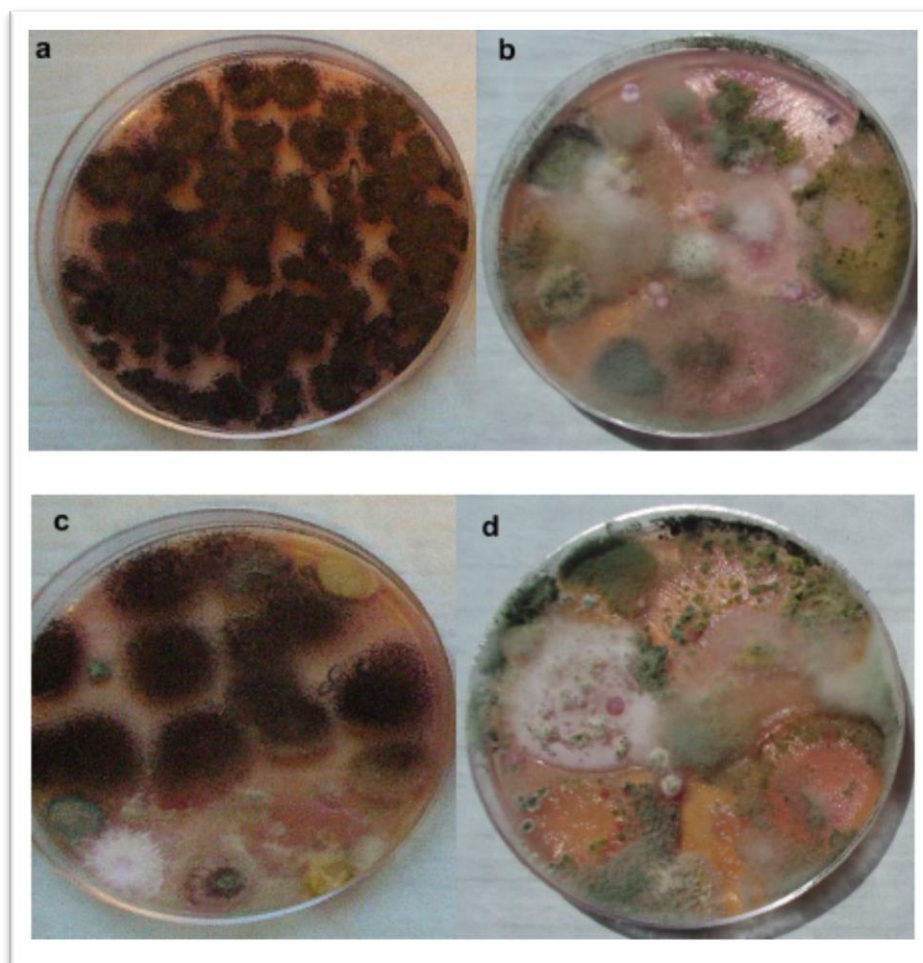
**Figura 44:** Recuento fúngico total (Log<sub>10</sub> UFC/g) de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC en los ensayos control y bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD. (E.E  $\pm$  0,01)

Respecto al análisis de la micobiota nativa de los microcosmos al inicio del experimento (día 1), los géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia fueron *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. tanto a 70 como a 30 CC. En general, los recuentos fúngicos en la condición de 70 CC fueron significativamente superiores que en la condición de 30 CC tanto en el control como en los diferentes tratamientos aplicados ( $p < 0,0001$ ). Una diferencia en verdad notable fue que a 70 CC se aisló el género *Aspergillus* spp., no solo en el control sino con la adición de 20 y 50 mM de clorpirifós, mientras que a 30 CC este género sólo se aisló en el control. Las cepas de *Aspergillus* aisladas no correspondieron a la sección *Flavi*. Respecto a *Penicillium* spp, cepas pertenecientes a este género, solo se aislaron de los tratamientos con insecticida a 70 CC, mientras que a 30 CC se aislaron en el tratamiento control y con 10 y 20 mM de clorpirifós. El otro género predominantemente aislado fue *Trichoderma* spp. cuyos recuentos mostraron diferencias significativas entre el control y los diferentes tratamientos para ambas CC ensayadas (**Figura 45**).



**Figura 45:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de los principales géneros fúngicos aislados de los microcosmos al día 1 de incubación acondicionados a 70 (A) y 30 (B) CC y adicionados con diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD. (E.E  $\pm 0,07$  para 70 CC y E.E  $\pm 0,01$  para 30 CC).

En la **figura 46** se muestran placas representativas de la micobiota aislada en el medio DRBC del control y de los microcosmos con 10 mM de clorpirifós, acondicionado a 70 y 30 de CC. Como se puede observar en los tratamientos se aisló una mayor diversidad de géneros fúngicos en comparación con los ensayos controles.

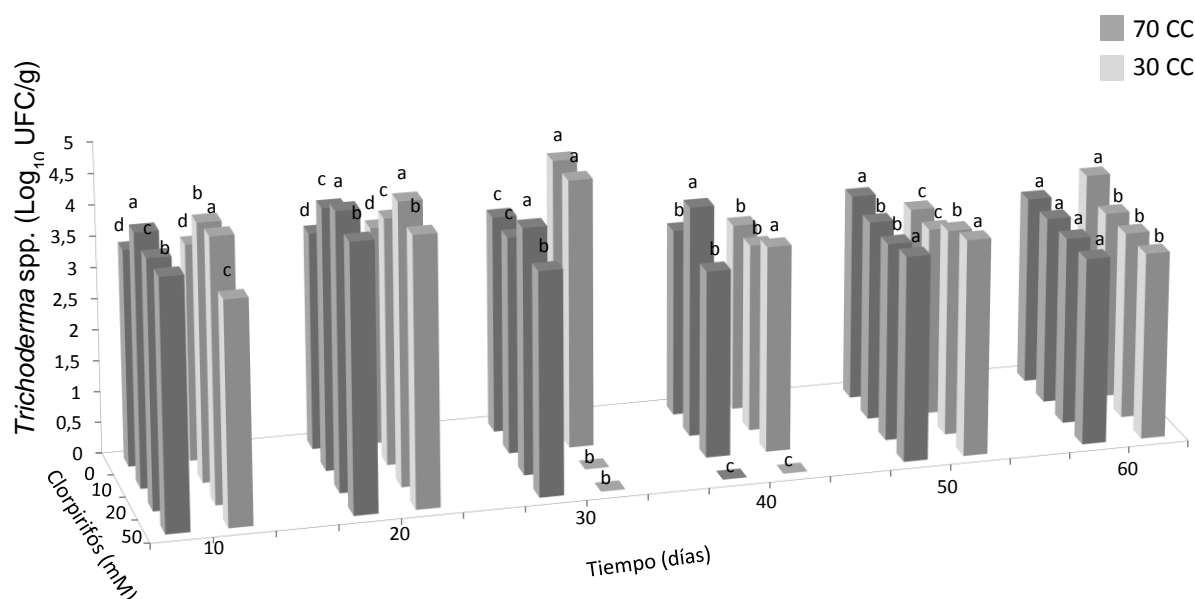


**Figura 46:** Distribución de la micobiota de los microcosmos en el medio DRBC a los 10 días de incubación. En **a** y **b** control y tratamiento a 70 CC; en **c** y **d** control y tratamiento a 30 CC, respectivamente.

Al analizar los recuentos de los géneros fúngicos prevalentes a lo largo del tiempo, se encontró que en general, el recuento del género *Trichoderma* spp. se mantuvo constante a lo largo del período de incubación. Los recuentos variaron desde 3,0 a 3,5 y de 3,0 a 4,4 Log<sub>10</sub> UFC/g a 70 y 30 CC, respectivamente, mientras que en los restantes tratamientos con clorpirifós, solo en algunas condiciones, se observó una disminución del recuento a medida



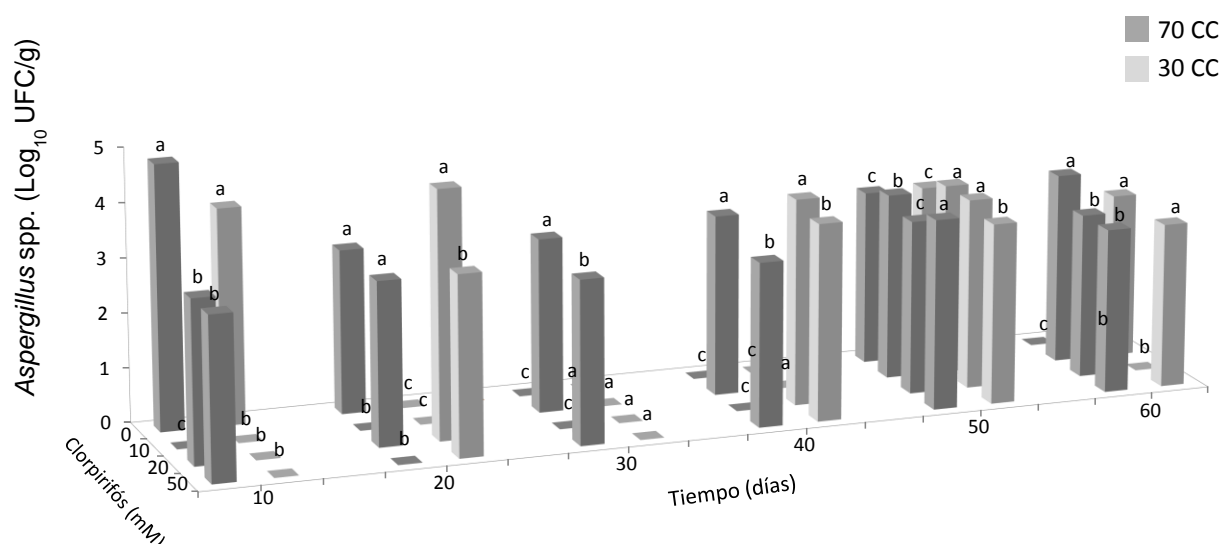
que aumentó la concentración de insecticida conforme transcurrieron los días de incubación. En general los recuentos de *Trichoderma* spp. se incrementaron a los 10 y 20 días de incubación en todos los tratamientos. A los 30 días no se aisló a 30 CC con 20 y 50 mM de clorpirifós. A los 40 días, la respuesta también varió acorde a la dosis aplicada, con 10 mM sólo se observó un incremento significativo respecto al control a 70 CC (**Figura 47**).



**Figura 47:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *Trichoderma* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD ( $E.E \pm 0,01$ ).

El género *Aspergillus* spp., a diferencia de lo ocurrido con el género *Trichoderma* spp., presentó una menor frecuencia de aislamiento en la condición control durante el período de incubación; aislándose a los 10 y 50 días a ambas CC; mientras que a los 20 días solo se aisló a 70 CC. A medida que transcurrió el tiempo de incubación de los diferentes tratamientos, aumentó la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* spp., de manera independiente de la dosis aplicada. En la mayoría de los tratamientos los recuentos observados fueron inferiores al correspondiente control. En la condición de 70 CC, con 10 mM de clorpirifós se observó un aumento en el recuento a medida que transcurrieron los días, mientras que con 20 y 50 mM (exceptuando casos puntuales), el recuento de *Aspergillus* spp. se mantuvo constante. En comparación con los correspondientes tratamientos controles, se observaron recuentos superiores sólo en algunas condiciones: a

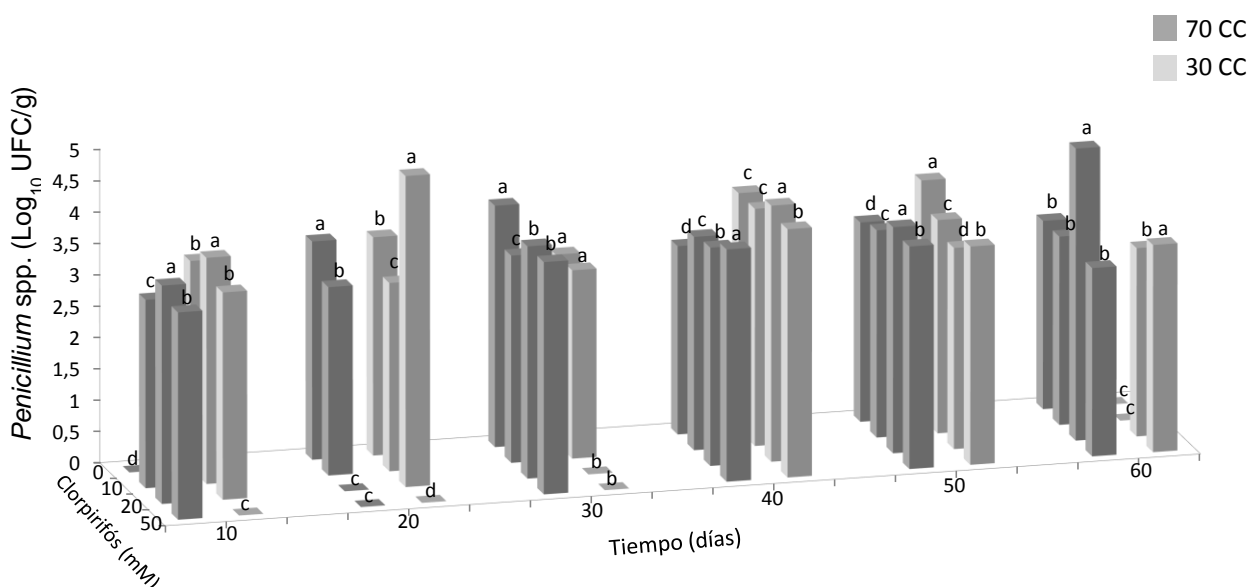
70 CC a los 50 días con 10 y 50 mM y a 30 CC también a los 50 días en todas las dosis de clorpirifós ensayadas (**Figura 48**).



**Figura 48:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *Aspergillus* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD ( $E.E \pm 0,01$ )

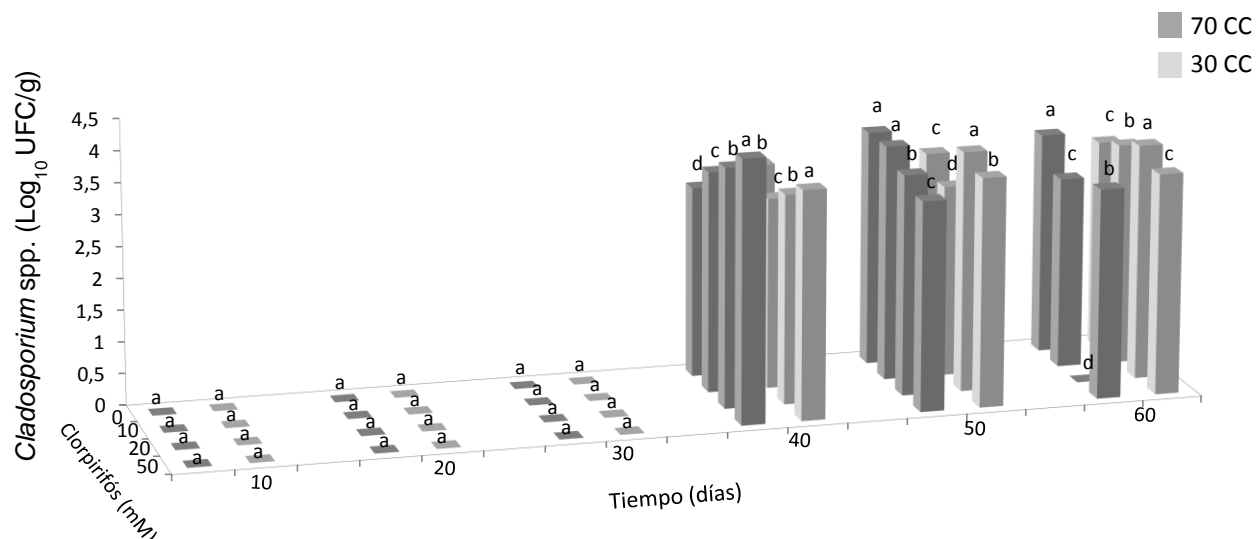
La **figura 49** muestra el recuento del género *Penicillium* spp. a lo largo del período de incubación. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) en el recuento de este género entre el tratamiento control y los diferentes tratamientos con clorpirifós. En el control, a los 10 y 60 días de incubación sólo se aisló a 30 y 70 CC, respectivamente. Los recuentos oscilaron de 3 a 3,77 y de 3 a 3,84 Log<sub>10</sub> UFC/g a 30 y 70 CC, respectivamente. A los 40 y 50 días hubo un incremento significativo del recuento a 30 CC en comparación a los primeros días de incubación (10, 20 y 30 días). Con 10 mM de clorpirifós y en la condición de 70 CC, el recuento del género *Penicillium* fue en aumento desde el día 20 al 40, solo fue significativamente superior al ensayo control a los 40 días de incubación. A 20 mM de clorpirifós no se aisló a los 20 y 30 días a 70 y 30 CC, respectivamente. A 30 CC, se evidenció un aumento significativo del recuento respecto al control a los 20 y 40 días de incubación. Mientras que a 70 CC este comportamiento sólo se observó a los 60 días. Con la dosis más alta de clorpirifós adicionada (50 mM) y a 30 CC, se aisló a partir del día 40, con valores similares o inferiores al control a excepción de los 40 días donde los recuentos fueron significativamente superiores al control. A 70 CC este género no fue aislado a los 20 días de incubación en las concentraciones más altas de clorpirifós; se percibió un aumento

del recuento hasta el día 40, a partir del cual comenzó a disminuir. Los recuentos fueron siempre similares o superiores al control.



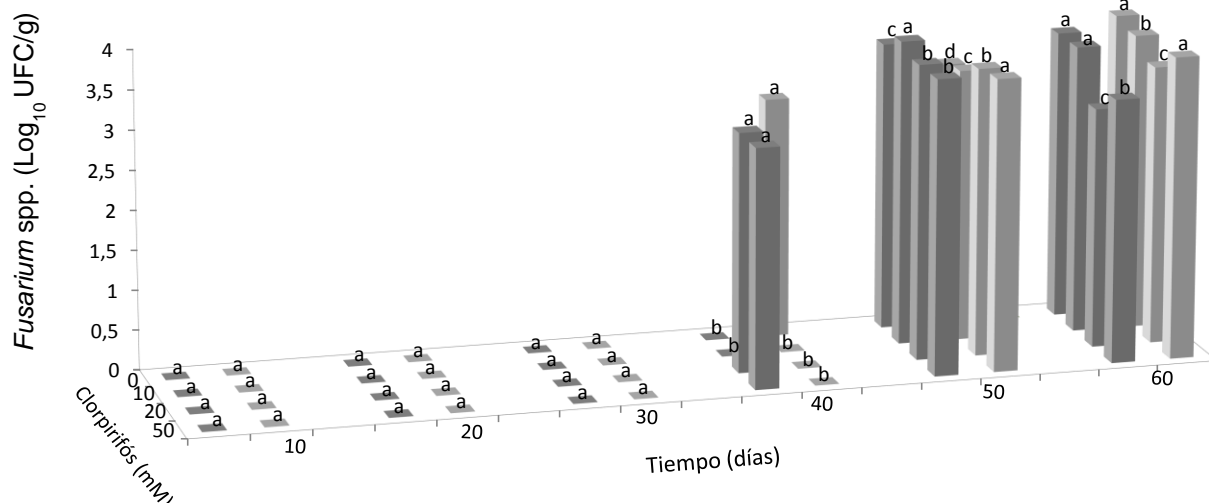
**Figura 49:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *Penicillium* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al test LSD ( $E.E \pm 0,01$ ).

El género *Cladosporium* spp., tanto en la condición control como en los diferentes tratamientos comenzó a aislarse a partir del día 40 a ambas CC. En la condición control, se aisló a los 40 días a 70 CC, observándose un aumento del recuento hasta el día 50 a ésta CC. Mientras que en la condición de 30 CC en general se mantuvo constante, aumentando significativamente respecto al control a los 60 días. Con 20 y 50 mM de clorpirifós se observó un aumento significativo del recuento a los 40 días sólo a 70 CC; y a 30 CC los recuentos aumentaron significativamente sólo a los 50 días (**Figura 50**).



**Figura 50:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *Cladosporium* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD ( $E.E \pm 0,01$ ).

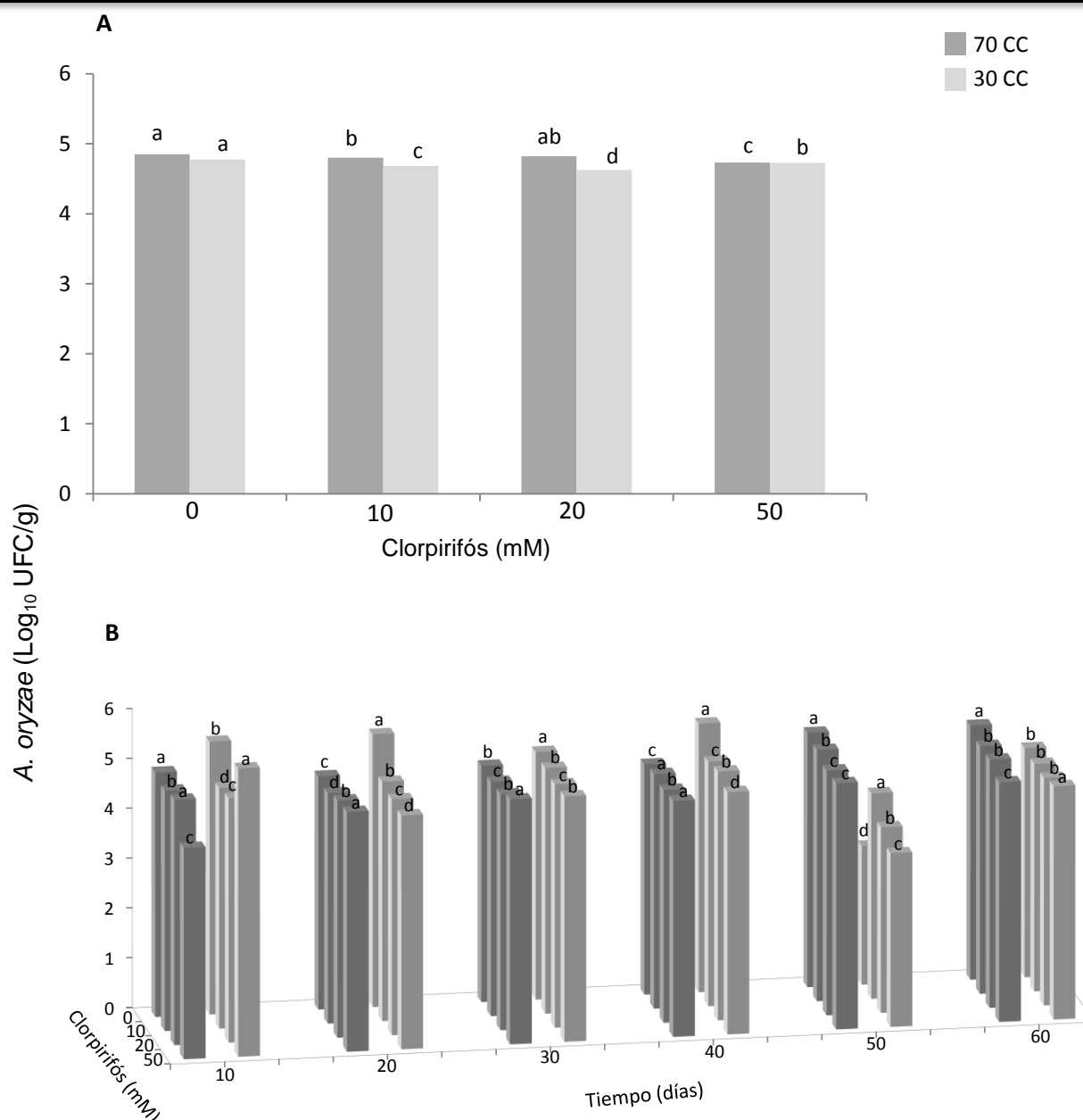
El género *Fusarium* spp. presentó un comportamiento similar al género *Cladosporium* spp.; comenzó a aislarse a partir de los últimos días de incubación. A los 50 y 60 días y a ambas CC se aisló tanto en la condición control como en los diferentes tratamientos. A 70 CC y a los 50 días el recuento con 10 y 20 mM fue mayor que el control. A 30 CC tanto con 20 y 50 mM de clorpirifós hubo un aumento del recuento respecto al control sólo a los 50 días de incubación (**Figura 51**).



**Figura 51:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *Fusarium* spp. aislados de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD. (E.E  $\pm 0,01$ ).

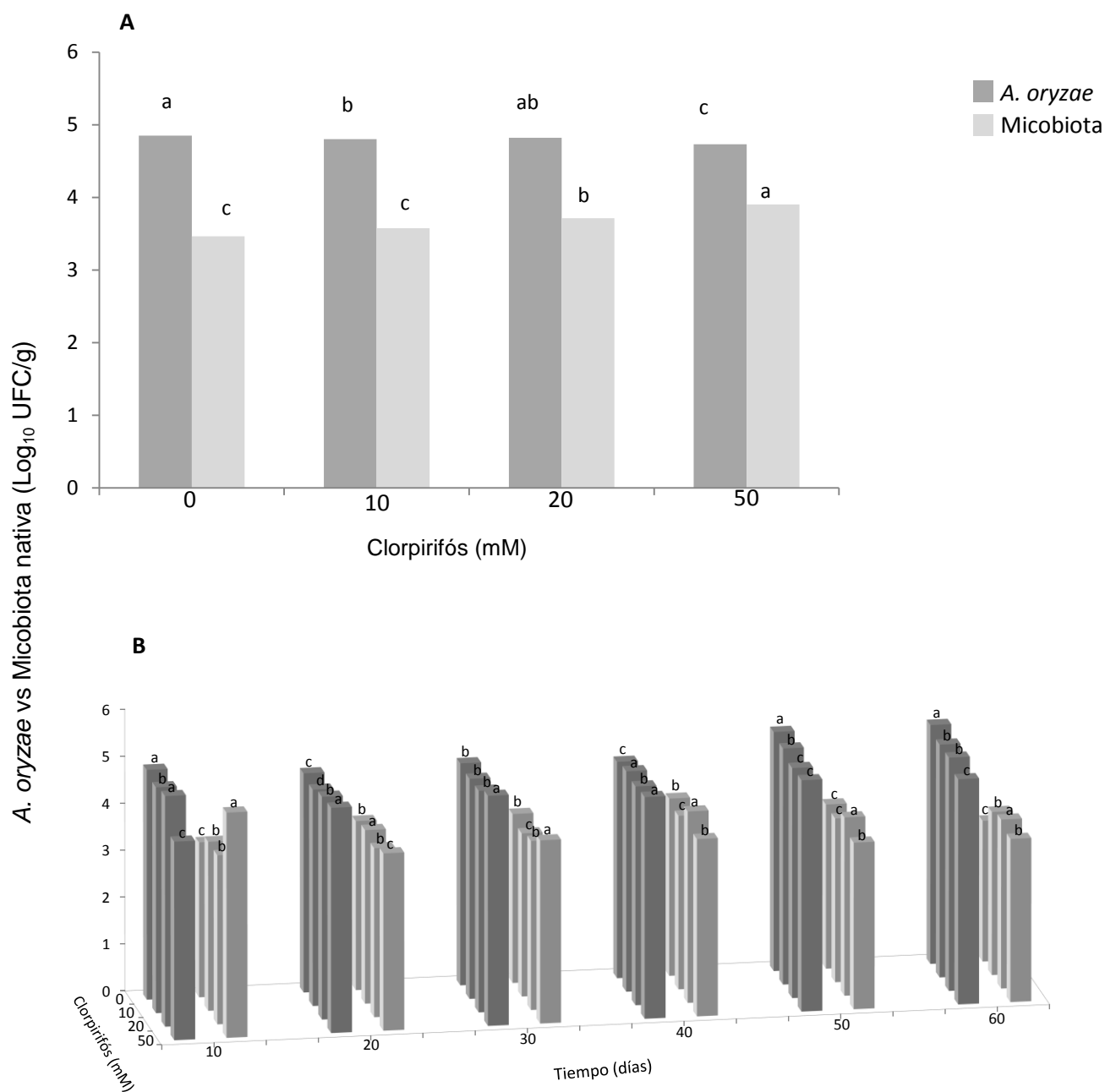
#### III.V.3.2.1- Evaluación *in situ* de la tolerancia a clorpirifós por *A. oryzae* AM1, en presencia de la micobiota nativa

La **figura 52** muestra el recuento de *A. oryzae* AM1 en los distintos tratamientos y condiciones ensayados. A 70 CC los recuentos de la cepa en los tratamientos con clorpirifós fueron similares o inferiores al correspondiente control. Mientras que a 30 CC, los valores de recuento en los microcosmos adicionados con el insecticida fueron significativamente menores con respecto al control (**Figura 52A**). Al analizar los distintos períodos muestreados, en el tratamiento control y en los primeros 40 días de incubación, el recuento de la cepa fue mayor a 30 CC con respecto a 70 CC. En esta última condición de CC, a los 20, 30 y 40 días con 50 mM del insecticida, y en la condición de 70 CC se observaron recuentos mayores con respecto al correspondiente control. Mientras que a 30 CC los recuentos en esos mismos días, fueron superiores en el control (**Figura 52B**).



**Figura 52:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *A. oryzae* AM1 aislada de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,01$ ).

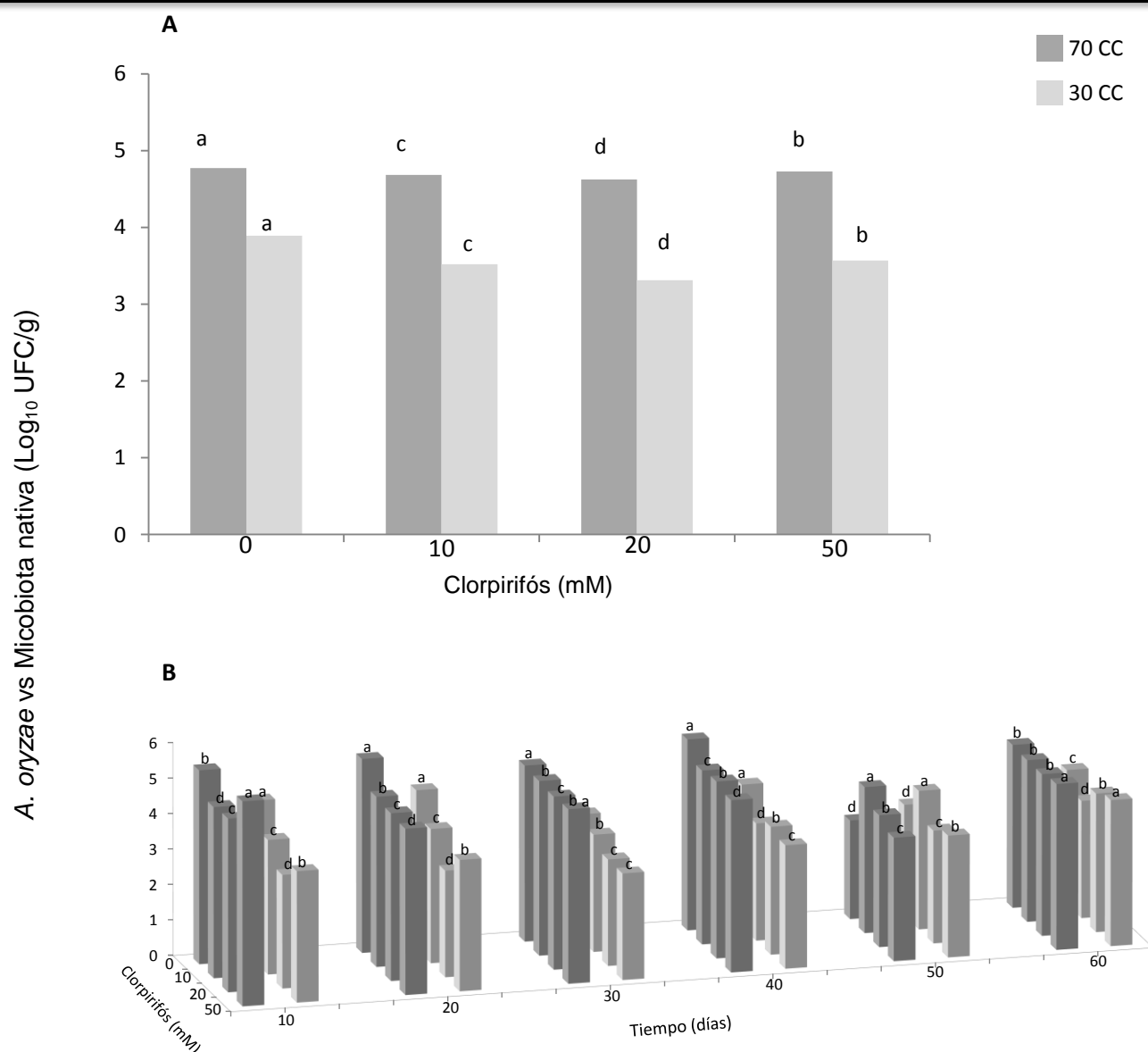
En las **figuras 53 y 54** se muestran los recuentos de *A. oryzae* AM1 en presencia de la micobiota en los diferentes tratamientos y condiciones ensayadas. Al analizar el comportamiento de la cepa de *A. oryzae*, se observó que la misma fue capaz de tolerar las diferentes dosis del insecticida evaluado tanto a 70 como a 30 CC en presencia de la micobiota nativa. A 70 CC, los recuentos de la cepa en los microcomos con clopirifós en general fueron similares o inferiores con respecto al control. Mientras que el recuento de la micobiota nativa fue significativamente mayor con el agregado de 20 y 50 mM con respecto al control (**Figura 53A**). Con respecto a los diferentes períodos muestreados, a 70 CC, a los 10, 50 y 60 días el recuento de *A. oryzae* fue superior en la condición control en comparación con los diferentes tratamientos, mientras que con 50 mM hubo un aumento del recuento a los 20, 30 y 40 días con respecto al control. Se observaron recuentos mayores a los 20 días con 10 mM, a los 40 y 60 días con 20 mM y a los 30 días con 50 mM con respecto al correspondiente control (**Figura 53B**).



**Figura 53:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *A. oryzae* AM1 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 70 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,01$ )

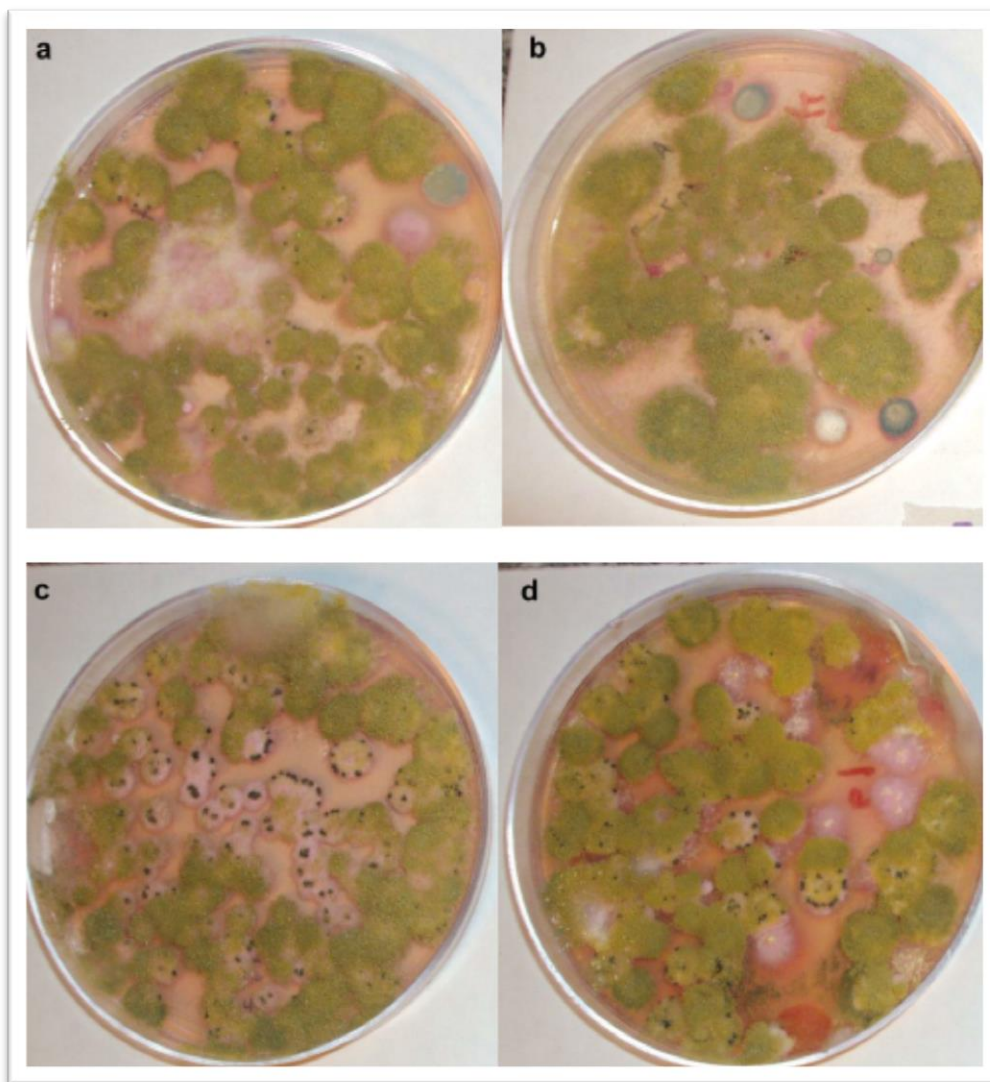


En la condición de 30 CC, los recuentos de *A. oryzae* y de la micobiota nativa, se comportaron de la misma manera, presentando los recuentos más elevados en la condición control y los más bajos con 20 mM de clorpirifós (**Figura 54A**). En esta condición de CC y a los 20, 30 y 40 días, la cepa de *A. oryzae* se comportó de manera inversa que en la condición de 70 CC, debido a que los mayores recuentos se observaron en el control y no con la concentración más elevada del pesticida. Bajo estas condiciones, también se registraron los mayores recuentos de la micobiota nativa. A los 50 días se obtuvieron los menores recuentos tanto de la cepa como de la micobiota en la condición control (**Figura 54B**).



**Figura 54:** Recuento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) de *A. oryzae* AM1 y la microbiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 30 CC bajo diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,01$ )

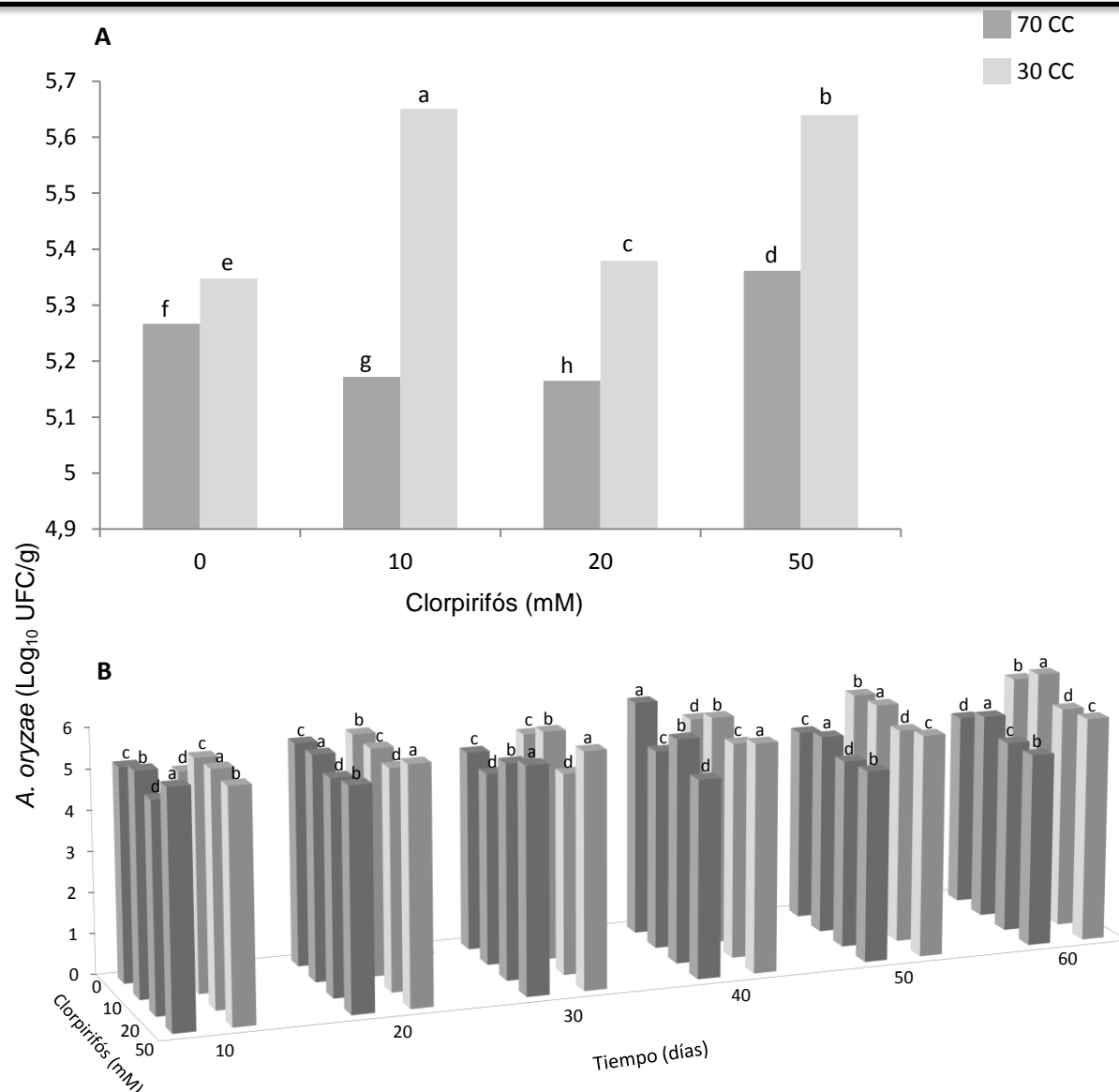
La **figura 55** muestra placas representativas de la cepa *A. oryzae* AM1 y de la micobiota nativa aisladas en el medio DRBC del control y de los microcosmos con 10 mM de clorpirifós y acondicionado a 70 y 30 de CC.



**Figura 55:** Distribución de la cepa *A. oryzae* AM1 y la micobiota nativa de los microcosmos en el medio DRBC a los 10 días de incubación. En **a** y **b** control y tratamiento a 70 CC; en **c** y **d** control y tratamiento a 30 CC, respectivamente.

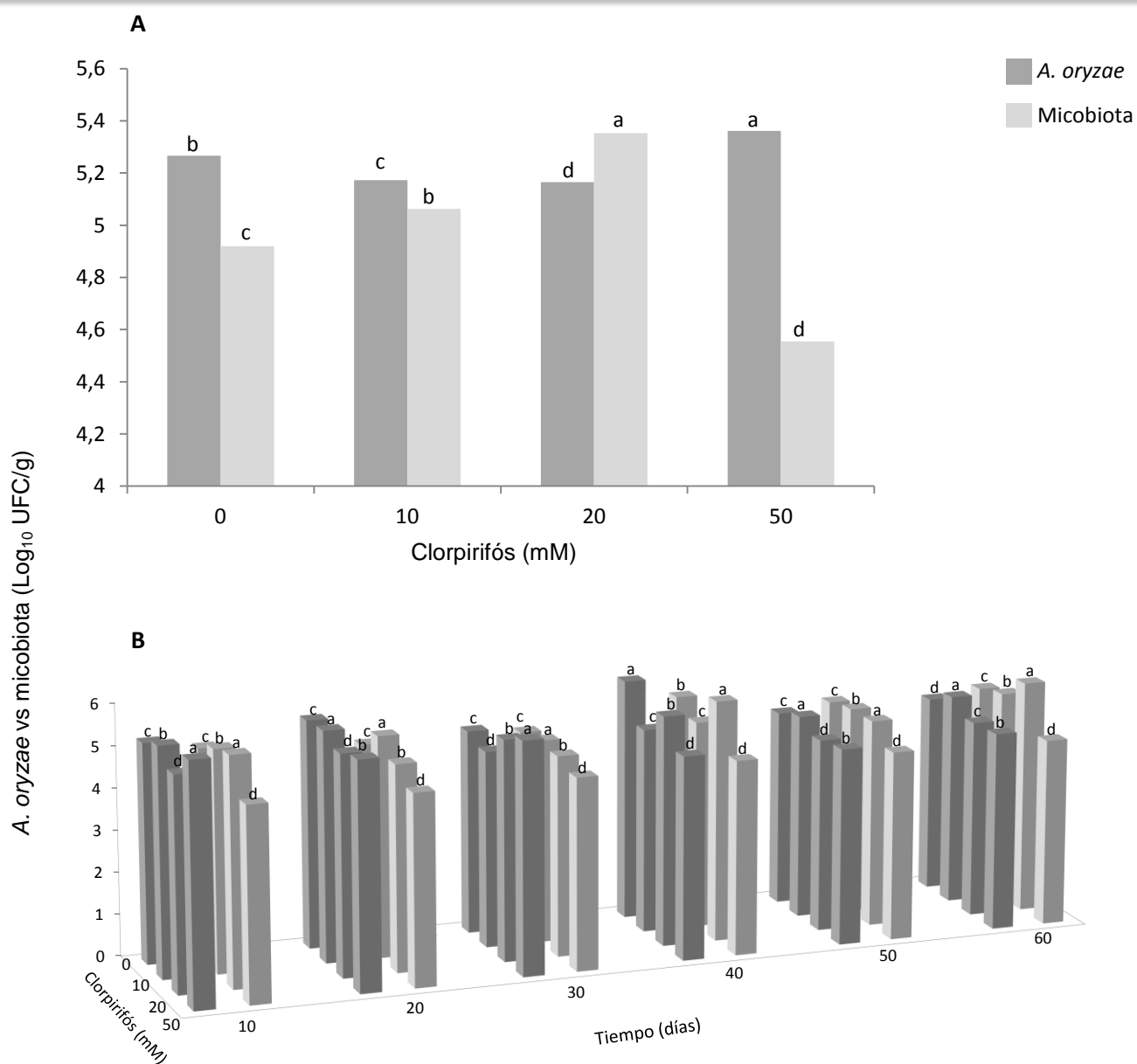
### III.V.3.2.2- Evaluación *in situ* de la tolerancia a clorpirifós por *A. oryzae* AM2, en presencia de la micobiota nativa

La **figura 56** muestra los recuentos de la cepa *A. oryzae* AM2 en los microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC y con el agregado de tres concentraciones de clorpirifós. En general los recuentos de esta cepa resultaron significativamente mayores en la condición de 30 CC en todos los tratamientos ( $p < 0,0001$ ). A 70 CC se observó que el recuento de *A. oryzae* AM2 disminuyó significativamente con el agregado de 10 y 20 mM de clorpirifós a los microcosmos con respecto al control. Mientras que con 50 mM de insecticida, el recuento resultó significativamente mayor que el del tratamiento control. A 30 CC, el recuento registrado en todos los tratamientos con el insecticida superó significativamente al recuento observado en el control (**Figura 56A**). A lo largo del período de incubación se observó que esta cepa se aisló de todos los tratamientos (**Figura 56B**). En general, a ambas CC se observó que ciertas concentraciones de clorpirifós provocaron un aumento significativo en el recuento de esta cepa en todos los períodos muestreados ( $p < 0,0001$ ). A 70 CC los recuentos de *A. oryzae* AM2 fueron mayores en los microcosmos adicionados con 10 y 20 mM de clorpirifós a los 10, 20, 50 y 60 días de incubación. Mientras que a 30 CC, los recuentos más elevados se registraron con 50 mM de insecticida a los 10, 20, 30 y 40 días de incubación. A los 50 y 60 días se observó un mayor recuento de esta cepa pero con 10 mM de insecticida.



**Figura 56:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *A. oryzae* AM2 de microcosmos acondicionados a 70 y 30 CC con la adición de diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM). El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,05$ ).

Al analizar el comportamiento de la cepa *A. oryzae* AM2 en presencia de la micobiota nativa, se observó que la misma fue capaz de tolerar las diferentes dosis del insecticida evaluado tanto a 70 como a 30 CC (**Figura 57 y 58**). A 70 CC, el recuento de la cepa de *A. oryzae* aumentó significativamente con el agregado de 50 mM de clorpirifós ( $p < 0,0001$ ). Lo mismo se observó para la micobiota nativa pero con 20 y 10 mM de insecticida (**Figura 57A**). En la mayoría de los períodos muestreados los valores más altos de recuento se registraron en alguno de los tratamientos con el insecticida. Sólo a los 40 días de incubación el mayor recuento se registró en el tratamiento control (**Figura 57B**).

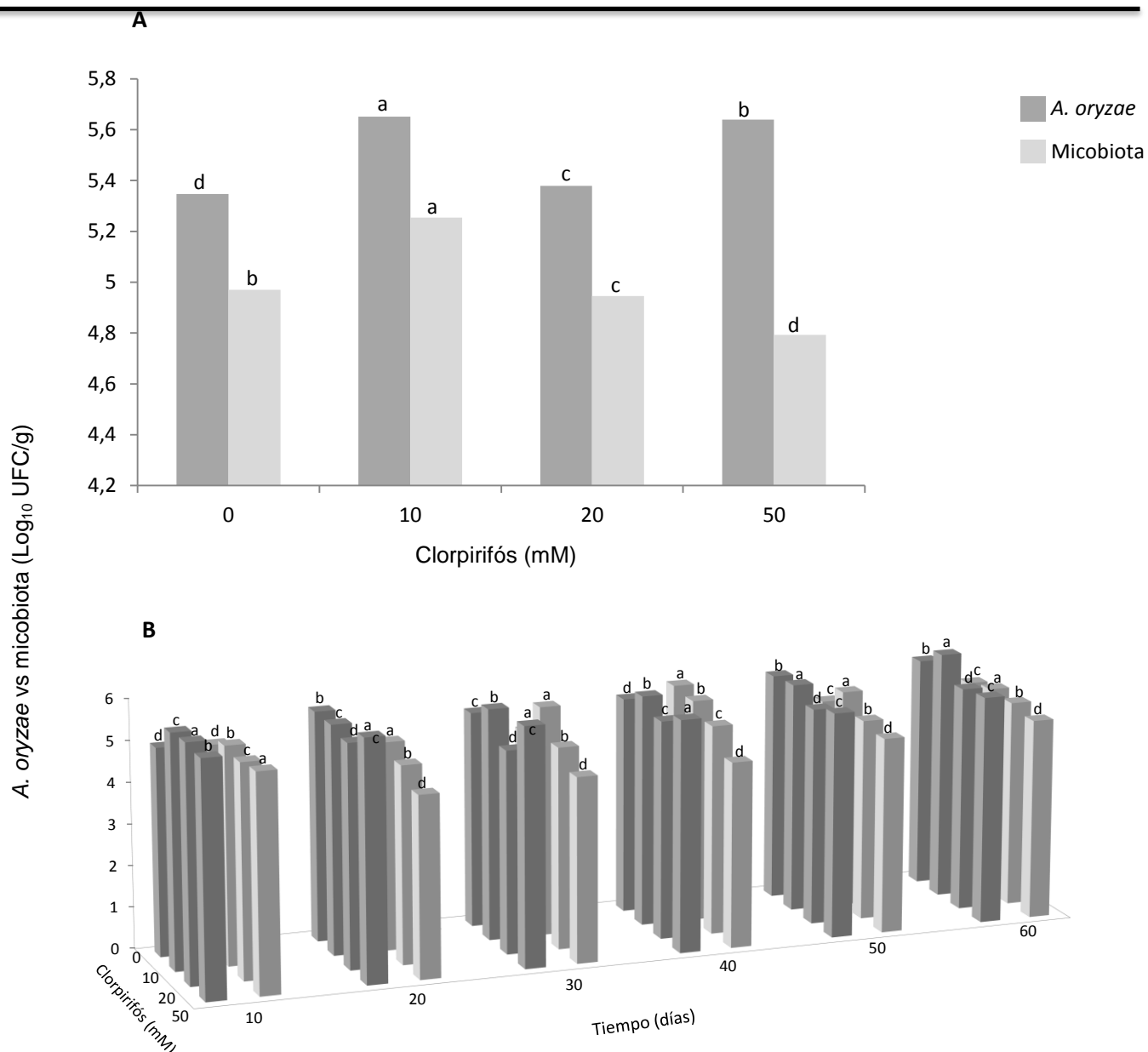


**Figura 57:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *A. oryzae* AM2 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 70 CC con la adición de diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM).

El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,05$ )

En la condición de 30 CC, el comportamiento de la cepa de *A. oryzae* y de la micobiota nativa fue diferente (**Figura 58**). Los recuentos de *A. oryzae* fueron significativamente mayores en los tratamientos con clorpirifós con respecto al tratamiento control. Mientras que esto fue observado también para la micobiota nativa sólo con 10 mM de clorpirifós (**Figura 58A**). En cuanto a los distintos períodos muestreados, se observó que el mayor recuento de *A. oryzae* se registró con 50 mM de clorpirifós a los 10, 20, 30 y 40 días de incubación. Mientras que a los 50 y 60 días, el mayor recuento se observó con 10 mM de insecticida (**Figura 58B**).





**Figura 58:** Recuento (Log<sub>10</sub> UFC/g) de *A. oryzae* AM2 y la micobiota nativa aislados de microcosmos acondicionados a 30 °C con la adición de diferentes concentraciones de clorpirifós (10, 20 y 50 mM).

El análisis estadístico se realizó comparando los datos de los controles con el correspondiente tratamiento, considerando los valores medios para cada tratamiento (**A**) y los valores en cada período de muestreo para cada tratamiento (**B**). Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ) de acuerdo al Test LSD (E.E.  $\pm 0,06$ )

En el presente trabajo, el análisis de la micobiota nativa en los distintos ensayos en microcosmos mostró que los géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia fueron *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. y *Penicillium* spp. Estos géneros también fueron informados en estudios previos como integrantes de la micobiota prevalentes en suelos agrícolas del sur de la provincia de Córdoba destinados al cultivo de soja y maíz (Nesci y col. 2006; Carranza y col. 2014).

Con respecto al recuento fúngico total, se observó que en general, los recuentos registrados en los microcosmos con clorpirifós fueron mayores en los tratamientos con 10 y 20 mM de insecticida a ambas CC ensayadas. Mientras que en los microcosmos con glifosato se observó que en ciertas condiciones el recuento fúngico fue menor con respecto al registrado en el control a 70 CC. Pero en la condición de 30 CC, los recuentos fueron más elevados en los microcosmos adicionados con el herbicida. Zain y col. (2013) también informaron que los recuentos fúngicos totales disminuían con concentraciones crecientes de ciertos herbicidas (entre ellos glifosato) en un ensayo en microcosmos de suelo. Estos resultados coinciden de manera parcial con lo observado en el presente trabajo. En otro trabajo realizado por Bisht y col. (2016) quienes informaron que el recuento fúngico total aumentaba al aplicarse concentraciones bajas de clorpirifós al suelo (1 a 2 mg/L); pero a concentraciones altas (5 a 500 mg/L), observaron una inhibición total de la micobiota. Estos resultados también coinciden parcialmente con el presente trabajo debido a que en algunas concentraciones de clorpirifós el recuento fúngico aumentaba a medida que el insecticida se incrementaba. Sin embargo, en ninguna de las concentraciones evaluadas se inhibió completamente el crecimiento de la micobiota.

Los tratamientos con los pesticidas afectaron de manera diferente la distribución de los géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia de los microcosmos. Los recuentos del género *Trichoderma* spp. en general se mantuvieron constantes tanto en los microcosmos como glifosato con clorpirifós. Con respecto a *Aspergillus* spp., no se observaron cambios significativos en los recuentos de este género a medida que aumentó la concentración de ambos pesticidas. Las especies de *Penicillium* spp. no fueron aisladas con frecuencia en los microcosmos con clorpirifós, pero al igual que lo observado a 30 CC con glifosato, en los tratamientos con clorpirifós, donde si se aislaron especies de este género, se observó que su recuento resultó mayor que el registrado en el respectivo control.

Estos resultados evidencian que el agregado de pesticidas al suelo puede provocar cambios en la composición y abundancia de la micobiota nativa del mismo favoreciendo o

estimulando aquellas especies tolerantes al xenobiótico agregado. Algunos autores establecen que la presencia de un contaminante en el ambiente supone una selección natural de las especies nativas más adaptadas en desmedro de las sensibles (Araujo y col. 2003; Girvan y col. 2004).

También se reportaronan diversos cambios en la estructura de comunidades microbianas expuestas a diferentes pesticidas. Zhang y col. (2015) observaron un cambio significativo en la estructura de la comunidad fúngica sólo cuando se aplicó la mayor concentración del organoclorado endosulfan. La cantidad de hongos se redujo significativamente después del primer día de tratamiento, y los valores se asemejaron al control a medida que transcurrió el tiempo de incubación. Estos resultados también indican que la incorporación de un pesticida al suelo condiciona el desarrollo de la micobiota tolerante a dicho pesticida. Este comportamiento con endosulfán también se informó para otros pesticidas (Adebayo y col. 2007; Joseph y col. 2010) y se atribuyó a una adaptación de la micobiota al pesticida. Por otro lado, Huang y col. (2016) evaluaron el efecto del clorpirifós en la abundancia y estructura de la comunidad fúngica de un suelo agrícola por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y electroforesis en gel desnaturalizante (DGGE). Ellos observaron que la aplicación del insecticida provocó una disminución significativa de la diversidad y abundancia fúngica, además detectaron un cambio en la composición de la misma al comparar los suelos tratados con los suelos controles (sin pesticida). Como particularidad observaron que el género *Fusarium* spp. fue uno de los más afectados, ya que su abundancia relativa se mantuvo constante en los suelos controles, luego disminuyó drásticamente con la aplicación de clorpirifós y volvió a aumentar transcurrido el tiempo de incubación, incluso ese aumento llegó a superar a la abundancia registrada en el control.

Si bien estos trabajos analizan diferentes parámetros y estudian diferentes grupos de microorganismos, en general se puede decir que los pesticidas provocan ciertos cambios en las comunidades nativas del suelo que llevarían a la selección de grupos capaces de adaptarse a ellos y hasta con la potencialidad de metabolizarlos. Pero además, es importante considerar que estos cambios en la estructura y diversidad microbiana pueden conducir a una pérdida de grupos microbianos esenciales en el ciclo de nutrientes dentro del ecosistema del suelo.

Los ensayos en microcosmos permitieron determinar que las cepas de *A. oryzae*, aisladas de suelos agrícolas, son tolerantes a las diferentes concentraciones de clorpirifós y glifosato aplicadas al suelo a 30 y 70 de CC; siendo estas concentraciones hasta 5 veces mayores a las utilizadas habitualmente a campo para el control de plagas. Además, se

observó que las cepas se mantuvieron viables y su recuento no se afectó en presencia de la microbiota nativa, sugiriendo que estas cepas de *Aspergillus* poseen capacidad para competir de manera eficiente en éste nicho ecológico tanto en condiciones óptimas de CC como en condiciones de estrés hídrico.

En numerosos trabajos ha sido propuesto el uso de cepas no toxicogénicas de la sección *Flavi* como agentes de control biológico, para prevenir la contaminación por aflatoxinas, a través de la exclusión competitiva de cepas toxicogénicas durante la infección (Tsitsigiannis y col. 2012; Alaniz Zanon y col. 2013). Sin embargo, es escasa la bibliografía acerca de la tolerancia *in situ* de pesticidas de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en presencia de la microbiota nativa en suelo. La mayoría de los estudios realizados determinaron la degradación de varios tipos de pesticidas por diversas especies de microorganismos (Qureshi y col. 2009; Serrano-Silva y col. 2009; Grenni y col. 2012; Giri y Rai 2012; Zhang y col. 2015). En un ecosistema la carencia de poblaciones indígenas de microorganismos degradadores de un contaminante puede ser superada por la inoculación de microorganismos extraños en el mismo sistema (Kengara y col. 2010). Esta estrategia, usualmente descrita como “bioaugmentación” consiste en la inoculación de una cepa o un consorcio microbiano con capacidad degradadora en el sistema contaminado (Wang y col., 2010). Zhang y col. (2015) analizaron la remoción de endosulfán (0,1 y 1,0 mg/kg) en microcosmos con suelo agrícola. Se observó más de 50% de eliminación del pesticida después de 42 días en presencia de la comunidad microbiana nativa del suelo. En otro estudio se demostró que también la comunidad microbiana nativa promovió la degradación de diversos compuestos (pesticidas y productos farmacéuticos) estudiados en suelo y agua (Grenni y col. 2012). Mientras que, Qureshi y col. (2009) observaron reducción del 90% de un contaminante organoclorado en microcosmos de suelo bioaugmentados con un consorcio microbiano. Recientemente, en un trabajo realizado por Arfarita y col. (2016), se evaluó la aplicación de una cepa de *Trichoderma viride* en suelo contaminado con glifosato. Estos autores observaron que la cepa fue capaz de colonizar, mantenerse y establecerse en el nicho ecológico ya que los recuentos de la misma aumentaron al final de la experiencia realizada. Estos resultados son similares a los observados en el presente trabajo, ya que los recuentos de las cepas *A. oryzae* AM1 y AM2 se mantuvieron constantes y hasta en algunos casos aumentaron a medida que transcurrió el tiempo de incubación en los microcosmos adicionados con los pesticidas aun en condiciones de estrés hídrico. Diferentes cepas de *Aspergillus* spp. han sido estudiadas en la degradación de pesticidas, como por ejemplo atrazina (Sene y col. 2010), pendimetalina (Caihong y col. 2011) y oxyfluorfen (Mohamed y

col. 2011). Actualmente, especies pertenecientes a este género fúngico están siendo cada vez más estudiadas debido a su alto potencial de producción de enzimas capaces de degradar pesticidas organofosforados (Fu y col. 2016; 2017; Shah y col. 2017).

Los estudios *in situ* permitieron corroborar la hipótesis planteada ya que las cepas de *A. oryzae* aisladas de suelos agrícolas expuestos a pesticidas, son tolerantes a clorpirifós y glifosato y se mantienen en el suelo en presencia de la micobiota nativa aun en condiciones de estrés hídrico. Dado que estos pesticidas son de uso extendido en el medio ambiente agrícola de nuestra región para el control de plagas y cada vez se conocen más efectos perjudiciales del mismo, tanto a nivel mediambiental como para la salud humana y animal, es fundamental establecer estrategias tendientes a su disminución en suelo. Estos resultados establecen la importancia de realizar estudios en microcosmos y en suelos para evaluar la tasa de degradación de éstas cepas y su potencial aplicación como agente de biorremediación.

### III.VI- Conclusiones

En base a la evaluación y discusión de los resultados de este capítulo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- *Aspergillus oryzae* AM1 y AM2 fueron capaces de remover el herbicida tanto cuando se encontraba como fuente de fósforo o nitrógeno, y los porcentajes de reducción superaron el 50%.
- Con concentraciones más elevadas de glifosato (10 mM), los porcentajes de remoción más significativos se observaron a 0,99 y 0,98 de  $a_w$  (57 y 38% respectivamente).
- Con respecto a clorpirifós, *A. oryzae* AM1 y AM2 fueron capaces de eliminar en promedio el 75% del clorpirifós a 0,98 y 0,95 de  $a_w$ . El proceso de remoción comenzó rápidamente, ya que en los primeros días de incubación se alcanzaron altos porcentajes de reducción y luego se mantuvo constante.
- Los bioensayos de fitotoxicidad revelaron que durante el proceso de remoción de glifosato y clorpirifós por la cepa *A. oryzae* AM1 hasta los 21 días y bajo condiciones óptimas de incubación se estarían formando metabolitos intermediarios, igualmente tóxicos al los pesticidas en sí.

- En los ensayos *in situ*, los géneros fúngicos de la micobiota nativa aislados en mayor frecuencia fueron *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.
- El comportamiento de la micobiota nativa en presencia de diferentes dosis de glifosato y clorpirifós, varió según el género fúngico; aislándose en los últimos períodos de incubación todos los géneros anteriormente mencionados.
- En los ensayos *in situ* las cepas *A. oryzae* AM1 y AM2 fueron capaces de tolerar diferentes concentraciones de glifosato y clorpirifós (10, 20 y 50 mM) a dos condiciones de capacidad campo (30 y 70) y mantenerse viables durante todo el período de incubación en presencia de la micobiota nativa.

# **CAPÍTULO IV**

## Capítulo IV. Conclusiones finales y perspectivas futuras

### IV.1- Conclusiones finales

En base a la evaluación y discusión de los resultados del presente trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- En los suelos agrícolas expuestos reiteradamente a pesticidas, se aíslan una amplia variedad de géneros fúngicos. *Aspergillus* spp. es uno de los géneros fúngicos más frecuentes de la micobiota cultivable, seguido por *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp. y el grupo de hongos denominados Micelio estéril, entre otros.
- Al comparar la micobiota cultivable de suelos con o sin exposición a pesticidas se comprobó que sólo algunos géneros fúngicos se aislaron de ambos tipos de suelo, destacando que las especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* se aislaron en alta frecuencia sólo en suelos expuestos a pesticidas.
- Del total de cepas de *A.* sección *Flavi* aisladas, la mayoría se identificó morfológicamente como *A. flavus*. El 98% de las cepas resultó productora de AFB<sub>1</sub> y/o ACP.
- Las especies de *A.* sección *Flavi* no toxicogénicas mostraron capacidad de tolerar *in vitro* diferentes dosis de glifosato y clorpirifós solos y en combinación usadas habitualmente en los cultivos de soja y maíz, como así también concentraciones más elevadas de estos pesticidas. Particularmente, con la más alta concentración de clorpirifós evaluada no se logró reducir en un 50% el crecimiento fúngico.
- Cuando se evaluaron los pesticidas combinados se observó que tanto la velocidad de crecimiento como la fase de latencia de todas las cepas se vio afectada negativamente cuando la concentración de clorpirifós se mantenía constante y aumentaba la concentración de glifosato.
- Las cuatro cepas de *A.* sección *Flavi* no toxicogénicas fueron capaces de desarrollar en un medio sintético adicionado con los pesticidas como única fuente de carbono, fósforo y/o nitrógeno; observándose cambios evidentes en la morfología de las colonias al variar la composición del medio de cultivo.
- El aumento en la fase de latencia en los medios adicionados con los pesticidas indicaría el carácter inductivo del proceso de degradación.



- *Aspergillus oryzae* AM1 y AM2 fueron capaces de remover glifosato *in vitro* tanto cuando se encontraba como fuente de fósforo o nitrógeno, y los porcentajes de reducción superaron el 50%. Con concentraciones más elevadas de glifosato (10 mM), los porcentajes de remoción más significativos se observaron a 0,99 y 0,98 de  $a_w$  (57 y 38% respectivamente).
- Con respecto a clorpirifós, *A. oryzae* AM1 y AM2 fueron capaces de eliminar en promedio el 75% del clorpirifós a 0,98 y 0,95 de  $a_w$ . El proceso de remoción comenzó rápidamente, ya que en los primeros días de incubación se alcanzaron altos porcentajes de reducción y luego se mantuvo constante.
- Los bioensayos de fitotoxicidad revelaron que durante el proceso de remoción de glifosato y clorpirifós por la cepa *A. oryzae* AM1 hasta los 21 días y bajo condiciones óptimas de incubación se estarían formando metabolitos intermediarios, igualmente tóxicos a los pesticidas en sí.
- En los ensayos *in situ*, los géneros fúngicos de la micobiota nativa aislados en mayor frecuencia fueron *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.
- El comportamiento de la micobiota nativa en presencia de diferentes dosis de glifosato y clorpirifós, varió según el género fúngico; aislándose en los últimos períodos de incubación todos los géneros anteriormente mencionados.
- En los ensayos *in situ* las cepas *A. oryzae* AM1 y AM2 fueron capaces de tolerar diferentes concentraciones de glifosato y clorpirifós (10, 20 y 50 mM) a dos condiciones de capacidad campo (30 y 70) y mantenerse viables durante todo el período de incubación en presencia de la micobiota nativa.

#### IV.II- Perspectivas futuras

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se propone:

- Continuar con la caracterización de las cepas de *A. oryzae* no toxicogénicas a fin de confirmar la ausencia de genes implicados en la producción de AFs y ACP.
- Determinar la capacidad de estas cepas de degradar los pesticidas en suelo en ausencia y presencia de la micobiota nativa del mismo.
- Evaluar la aparición de los principales metabolitos involucrados en la degradación de los pesticidas.

# **CAPÍTULO V**

## Capítulo V. Bibliografía

### V. Bibliografía

Abarca, M.L. (2000) «Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis» *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 79-84.

Abo-Amer, A. (2011) «Biodegradation of Diazinon by *Serratia marcescens* D1101 and its Use in Bioremediation of Contaminated Environment», *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), pp. 71-80.

Accinelli, C., Koskinen, W. C., Seebinger, J. D., Vicari, A. y Sadowsky, M. J. (2005) «Effects of incorporated corn residues on glyphosate mineralization and sorption in soil», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 4110-4117. doi: 10.1021/jf050186r.

Adebayo, T. A., Ojo, O. A. y Olaniran, O. A. (2007) «Effect of two insecticides karate and thiodan on population dynamics of four different soil microorganisms», *Research Journal of biological sciences*, 2(5), pp. 557-560.

Alaniz Zanon, M. S., Chiotta, M. L., Gaj-Merlera, G., Barros, G. y Chulze, S. (2013) «Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts», *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 162, pp. 220-225. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.017.

Allegri, M., Gomez, E. V y Zabaloy, M. C. (2017) «Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids», *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier Ltd, 105, pp. 206-215. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.11.024.

Álvarez-Martín, A., Hilton, S. L., Bending, G. D., Rodríguez-Cruz, M. S. y Sánchez-Martín, M. J. (2016) «Changes in activity and structure of the soil microbial community after application of azoxystrobin or pirimicarb and an organic amendment to an agricultural soil», *Applied Soil Ecology*, 106, pp. 47-57. doi: 10.1016/j.apsoil.2016.05.005.

Álvarez, A., Benimeli, C. S., Saez, J. M., Giuliano, A. y Amoroso, M. J. (2015) «Lindane removal using *Streptomyces* strains and maize plants: a biological system for reducing pesticides in soils», *Plant Soil*, 395(1-2), pp. 401-413. doi: 10.1007/s11104-015-2575-5.

Álvarez, M., Mortier, C. y Fernández-Cirelli, A. (2013) «Behavior of insecticide chlorpyrifos on soils and sediments with different organic matter content from provincia de Buenos Aires, República Argentina», *Water, Air, & Soil Pollution*, 224, p. 1453. doi: 10.1007/s11270-013-1453-0.

Anderson, J. A. y Kolmer, J. A. (2005) «Rust control in glyphosate tolerant wheat following application of the herbicide glyphosate», *Plant Disease*, 89, pp. 1136-1142.

Anza, M., Epelde, L., Artetxe, U., Becerril, J. M. y Garbisu, C. (2016) «Control of *Cortaderia selloana* with a glyphosate-based herbicide led to a short-term stimulation of soil fungal communities», *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, pp. 1-6. doi: 10.1007/s10661-016-5649-9.

Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P. y Costa, J. L. (2013) «Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins», *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 93, pp. 1866-1873. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.041.

Arango, L., Buddrus-Schiemann, K., Opelt, K., Lueders, T., Haesler, F., Schmid, M., Ernst, D. y Hartmann, A. (2014) «Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready soybean», *European Journal of Soil Biology*. Elsevier Masson SAS, 63, pp. 41-48. doi: 10.1016/j.ejsobi.2014.05.005.

Araujo, A. S. F., Monteiro, R. T. R. y Abarkeli, R. B. (2003) «Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils», *Chemosphere*, 52, pp. 799-804. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00266-2.

Arfarita, N., Djuhari, Prasetya, B. y Imai, T. (2016) «The application of *Trichoderma viride* strain frp 3 for biodegradation of glyphosate herbicide in contaminated land», *Agrivita Journal of Agricultural Science*, 38(3), pp. 275-281. doi: 10.17503/agrivita.v38i3.550.

Arfarita, N., Imai, T., Kanno, A., Yarimizu, T., Xiaofeng, S., Jie, W., Higuchi, T. y Akada, R. (2013) «The potential use of *Trichoderma viride* strain frp3 in biodegradation of the herbicide glyphosate», *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(1), pp. 3518-3521.

Arfarita, N., Imai, T. y Prasetya, B. (2014) «Potential use of soil-born fungi isolated from treated soil in Indonesia to degrade glyphosate herbicide», *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 1(2), pp. 63-68.

- Bai, S. H. y Ogbourne, S. M. (2016) «Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination», *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), pp. 18988-19001. doi: 10.1007/s11356-016-7425-3.
- Balajee, S.A., Gribskov, J.L., Hanley, E., Nickle, D. y Marr, K.A. (2005) «*Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*», *Eukaryotic Cell*, 4, pp. 625-632.
- Barberis, C. L., Carranza, C. S., Chiacchiera, S. M. y Magnoli, C. E. (2013) «Influence of herbicide glyphosate on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from soil on in vitro assay.», *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(12), pp. 1070-9. doi: 10.1080/03601234.2013.824223.
- Barja, B. C. y dos Santos Afonso, M. (2005) «Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: A comparative study», *Environmental Science and Technology*, 39, pp. 585-592. doi: 10.1021/es035055q.
- Barros, G., Torres, A. y Chulze, S. (2005) «*Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, pp. 2349-2353. doi: 10.1002/jsfa.2257.
- Barros, G., Torres, A., Palacio, G. y Chulze, S. (2003) «*Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, pp. 1303-1307. doi: 10.1002/jsfa.1539.
- Baskaran, S., Kookana, R. S. y Naidu, R. (1999) «Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates», *Pesticide Science*, 55, pp. 1222-1228.
- Bhagobaty, R. K. y Malik, A. (2008) «Utilization of chlorpyrifos as a sole source of carbon by bacteria isolated from wastewater irrigated agricultural soils in an industrial area of western Uttar Pradesh, India», *Research Journal of Microbiology*, 3(5), pp. 293-307.
- Bisht, J., Harsh, N.S.K., Palni, L.M.S. y Pande, V. (2016), «Effect of repeated application of chlorpyrifos on fungal population of pine forest soil», *Indian Forester*, 142(3), pp. 253-259.
- Bolsa de cereales, Estimaciones agrícolas. Panorama agrícola semanal. Disponible en: <http://www.bolsadecereales.com/>. Fecha de acceso: diciembre 2017.
- Bolsa de comercio de Rosario (2016). Informativo semanal. Marzo 2016. Disponible en: <http://www.bcr.com.ar/default.aspx>. Fecha de acceso: diciembre 2017.
- Bonfleur, E. J., Tornisiello, V. L., Regitano, J. B. y Lavorenti, A. (2015) «The effects of glyphosate and atrazine mixture on soil microbial population and subsequent impacts on their fate in a tropical soil», *Water, Air, and Soil Pollution*, 226, p. 21. doi: 10.1007/s11270-014-2190-8.
- Briceño, G., Fuentes, M. S., Palma, G., Jorquera, M. A., Amoroso, M. J. y Diez, M. C. (2012) «Chlorpyrifos biodegradation and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil», *International Biodeterioration and Biodegradation*, 73, pp. 1-7. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.06.002.
- Cabello, M. y Arambarri, A. (2002) «Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina)», *Microbiological Research*, 157, pp. 115-125. doi: 10.1078/0944-5013-00138.
- Caihong, Y., Yingnan, S., Ronghua, L., Hui, J. y Xiaojun, W. (2011) «Biodegradation of Pendimethalin by two fungus strains isolated from soil in China». *Bioinformatics and Biomedical Engineering, (iCBBE) 2011 5th International Conference*, pp. 1-5.
- Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) (2005). Evolución del mercado fitosanitario argentino Buenos Aires Argentina. Disponible en: <http://www.casafe.org.ar/m2005.htm>. Fecha de acceso: diciembre 2017.
- Camiletti, B. X., Torrico, A. K., Maurino, M. F., Cristos, D., Magnoli, C., Lucini, E. I. y Giménez Pecci, M. P. (2017) «Fungal screening and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* isolated from pre-harvest maize ears grown in two Argentine regions», *Crop Protection*, 92, pp. 41-48. doi: 10.1016/j.cropro.2016.10.012.
- Cantero, A., Bricchi, E.M., Cisneros, J., Becerra, V.H. y Gil G. (1999) «Un índice de aptitud relativa de tierras con fines catastrales. Aplicación al Departamento Río Cuarto (Córdoba, Argentina)», *Investigaciones Agropecuarias. Producción y Protección Vegetal*, 14, pp. 259-272.
- Carranza, C. S., Barberis, C. L., Chiacchiera, S. M. y Magnoli, C. E. (2014b) «Influence of the pesticides glyphosate, chlorpyrifos and atrazine on growth parameters of nonochratoxigenic *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from agricultural soils», *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 49, pp. 747-755. doi:

10.1080/03601234.2014.929860.

Carranza, C. S., Bergesio, M. V., Barberis, C. L., Chiacchiera, S. M. y Magnoli, C. E. (2014a) «Survey of *Aspergillus* section *Flavi* presence in agricultural soils and effect of glyphosate on nontoxicogenic *A. flavus* growth on soil-based medium», *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), pp. 1229-1240. doi: 10.1111/jam.12437.

CAST (2003) «Micotoxins: Risks in plant, animal and humans systems». Council of Agricultural Science and Technology, CAST, Ames, IA. Task Force Report N° 139.

Castro, J. V., Peralba, M. C. R. y Ayub, M. A. Z. (2007) «Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor.», *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 42, pp. 883-6. doi: 10.1080/03601230701623290.

Chen, S., Liu, C., Peng, C., Liu, H., Hu, M. y Zhong, G. (2012) «Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a new fungal strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01», *PLoS ONE*, 7(10), pp. 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0047205.

Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K. R., Khalid, A. y Arshad, M. (2013) «Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil», *Journal of Environmental Management*. Elsevier Ltd, 114, pp. 372-80. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.10.032.

Chu, X., Fang, H., Pan, X., Wang, X., Shan, M., Feng, B. y Yu, Y. (2008) «Degradation of chlorpyrifos and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations», *Journal of Environmental Sciences*, 20, pp. 464-469.

Costa, M., Torres, M., Magariños, H. y Reyes, A. (2010) «Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales» *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, pp. 163-175.

Cotty, P. J. y Cardwell, K. F. (1999) «Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*», *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), pp. 2264-2266.

Dallyn, H. y Fox, A. (1980) «Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi», In *Microbial Growth and Survival in Extreme Environments*; Gould, G.H., Corry, J.E.L., Eds.; Academic Press: London, New York, 1980; 129139.

Damalas, C. A. y Eleftherohorinos, I. G. (2011) «Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators.», *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, pp. 1402-19. doi: 10.3390/ijerph8051402.

Dhanya, M. S. (2014) «Advances in microbial biodegradation of chlorpirifos», *Journal of Environmental Research and Development*, 9(1), pp. 232-240.

Diez, M. C. (2010) «Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants», *Journal of Soil Science and Plant Nutrient*, 10(3), pp. 244-267.

Domagalski, J.L. y Munday, C. (2003) «Evaluation of Diazinon and Chlorpyrifos Concentrations and Loads, and Other Pesticide Concentrations, at Selected Sites in the San Joaquin Valley, California, April to August, 2001». United States Geologic Survey.

Dorner, J.W. (2010) «Efficacy of a biopesticide for control of aflatoxins in corn», *Journal of Food Protection*, 73, pp. 495-499.

Druille, M., García-Parisi, P. A., Golluscio, R. A., Cavagnaro, F. P. y Omacini, M. (2016) «Repeated annual glyphosate applications may impair beneficial soil microorganisms in temperate grassland», *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Elsevier B.V., 230, pp. 184-190. doi: 10.1016/j.agee.2016.06.011.

Duke, S. O. y Powles, S. B. (2008) «Glyphosate: a once-in-a-century herbicide Stephen», *Pest Management Science*, 64, pp. 319-325. doi: 10.1002/ps.

Environmental Protection Agency (EPA) (1999). Disponible en: [www.epa.gov](http://www.epa.gov). Fecha de acceso: diciembre 2017.

Environmental Protection Agency (EPA) (2006). Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Disponible en: [www.epa.gov](http://www.epa.gov). Fecha de acceso: diciembre 2017.

Environmental Protection Agency (EPA) (2007). Disponible en: [www.epa.gov](http://www.epa.gov). Fecha de acceso: diciembre 2017

Eman, A., Abdel-megeed, A., Suliman, A. A., Sadik, M. W. y Sholkamy, E. N. (2013) «Biodegradation of Glyphosate by fungal strains isolated from herbicides polluted-soils in Riyadh

area», *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 2(8), pp. 359-381.

Fang, H., Xiang, Y. Q., Hao, Y. J., Chu, X. Q., Pan, X. D., Yu, J. Q. y Yu, Y. L. (2008) «Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi», *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61, pp. 294-303. doi: 10.1016/j.ibiod.2007.10.001.

Fang, H., Yu, Y. L., Wang, X., Shan, M., Wu, X. M. y Yu, J. Q. (2006) «Dissipation of chlorpyrifos in pakchoi-vegetated soil in greenhouse», *Journal of Environmental Sciences*, 18(4), pp. 760-764.

Feng, P. C. C., Baley, G. J., Clinton, W. P., Bunkers, G. J., Alibhai, M. F., Paulitz, T. C. y Kidwell, K. K. (2005) «Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48), pp. 17290-17295.

Fernandez, G. (2007). *Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado*. Tesis Doctorado. Jaboticabal, Sao Paulo, Brasil, Universidad de Estadual Paulista. 60p

Fernandez, M. R., Zentner, R. P., Basnyat, P., Gehl, D., Selles, F. y Huber, D. (2009) «Glyphosate associations with cereal diseases caused by *Fusarium* spp. in the Canadian Prairies», *European Journal of Agronomy*, 31, pp. 133-143. doi: 10.1016/j.eja.2009.07.003.

Fragoeiro, S. y Magan, N. (2005) «Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*», *Environmental Microbiology*, 7(3), pp. 348-355. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00699.x.

Fu, G. M., Chen, Y., Li, R. Y., Yuan, X. Q., Liu, C. M., Li, B. y Wan, Y. (2017) «Pathway and rate-limiting step of glyphosate degradation by *Aspergillus oryzae* A-F02», *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. doi: 10.1080/10826068.2017.1342260.

Fu, G. M., Li, R. Y., Li, K. M., Hu, M., Yuan, X. Q., Li, B., Wang, F. X., Liu, C. M. y Wan, Y. (2016) «Optimization of liquid-state fermentation conditions for the glyphosate-degradation enzyme production of strain *Aspergillus oryzae* by ultraviolet mutagenesis», *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(8), pp. 780-787. doi: 10.1080/10826068.2015.1135462.

Gao, Y., Chen, S., Hu, M., Hu, Q., Luo, J. y Li, Y. (2012) «Purification and characterization of a novel chlorpyrifos hydrolase from *Cladosporium cladosporioides* Hu-01.», *PLoS ONE*, 7(6), p. e38137. doi: 10.1371/journal.pone.0038137.

Gebremariam, S. Y., Beutel, M. W., Yonge, D. R., Flury, M. y Harsh, J. B. (2012) «Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments», en Whitacre, D. M. (ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York, NY: Springer New York (Reviews of Environmental Contamination and Toxicology), pp. 124-173. doi: 10.1007/978-1-4614-1463-6.

Geisen, R. (1996) «Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi», *Systematic and Applied Microbiology*, 19, pp.388-392.

Geiser, D.M. (2004) Practical molecular taxonomy of fungi. In: *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture*. Kluwer Academic Publishers pp. 1-12.

Geiser, D.M., Pitt J.I. y Taylor J.W. (1998) «Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, pp. 388-393.

Ghanem, I., Orfi, M. y Shamma, M. (2017) «Biodegradation of chlorpyrifos by *Klebsiella* sp. isolated from an activated sludge sample of waste water treatment plant in damascus», *Folia Microbiologica*, 52(4), pp. 423-427. doi: 10.1007/BF02932098.

Giaj Merlera, G., Muñoz, S., Coelho, I., Cavaglieri, L. R., Torres, A. M. y Reynoso, M. M. (2015) «Diversity of black *Aspergilli* isolated from raisins in Argentina: Polyphasic approach to species identification and development of SCAR markers for *Aspergillus ibericus*», *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 210, pp. 92-101. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.025.

Gianfreda, L. y Rao, M. A. (2004) «Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review», *Enzyme and Microbial Technology*, 35, pp. 339-354. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.05.006.

Giesy, J.P., Dobson, S. y Solomon, K.R. (2000) «Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide», *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, pp.35-120.

Gilani, S. T. S., Ageen, M., Shah, H. y Raza, S. (2010) «Chlorpyrifos degradation in soil and its effect on soil microorganisms», *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 20(2), pp. 99-102.

Giri, K. y Rai, J. P. N. (2012) «Biodegradation of endosulfan isomers in broth culture and soil microcosm by *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil», *International Journal of Environmental Studies*, 69(5), pp. 729-742. doi: 10.1080/00207233.2012.702480.

Girvan, M. S., Bullimore, J., Ball, A. S., Pretty, J. N. y Osborn, A. M. (2004) «Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens.», *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), pp. 2692-2701. doi: 10.1128/AEM.70.5.2692.

Glass, N. L. y Donaldson, G. C. (1995) «Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes», *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), pp. 1323-1330.

Gonçalves, J. S., Ferracin, L. M., Carneiro Vieira, M. L., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H. y Pelegrinelli Fungaro, M. H. (2012) «Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts.», *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, pp. 1817-25. doi: 10.1007/s11274-011-0956-3.

Grenni, P., Falconi, F. y Caracciolo, A. B. (2012) «Microcosm experiments for evaluating natural bioremediation of contaminated ecosystems», *Chemical Engineering Transactions*, 28, pp. 7-12. doi: 10.3303/CET1228002.

Hadrich, I., Makni, F., Neji, S., Cheikhrouhou, F., Sellami, H. y Ayadi, A. (2011) «A Review Molecular Typing Methods for *Aspergillus flavus* Isolates», *Mycopathologia*, 172, pp.83-93.

Halimah, M., Tan-Yew, A., Ismail, S. y Nashriyah, M. (2010) «Donward movement of chlorpyrifos in the soil of an oil palm plantation in Sepang, Selangor, Malaysia», *Journal of Oil Palm Research*, 22, pp. 721-728.

Hanson, K.G. y Fernandez, M.R. (2003) «Glyphosate herbicides affect plant pathogenic fungi», *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25, pp.120.

Harms, H., Schlosser, D. y Wick, L. Y. (2011) «Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals», *Nature Reviews. Microbiology*, 9, pp. 177-192. doi: 10.1038/nrmicro2519.

Hasan, H. A. H. (1999a) «Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil.», *Folia Microbiologica*, 44(1), pp. 77-84.

Hasan, H. A. H. (1999b) «Mode of action of pesticides on aflatoxin biosynthesis and oxidase system activity.», *Microbiological Research*. Urban & Fischer Verlag, 154, pp. 95-102. doi: 10.1016/S0944-5013(99)80041-X.

Hindumathy, C. K. y Gayathri, V. (2013) «Effect of pesticide (chlorpyrifos) on soil microbial flora and pesticide degradation by strains isolated from contaminated soil», *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 4(2), p. 178. doi: 10.4172/2155-6199.1000178.

Hong, S. B., Cho, H. S., Shin, H. D., Frisvad, J. C. y Samson, R. A. (2006) «Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea», *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, pp. 477-86. doi: 10.1099/ijls.0.63980-0.

Horn, B.W. (2003) «Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil», *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 22, pp. 351–379.

Horn, B. W. y Dorner, J. W. (1999) «Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States», *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), pp. 1444-1449.

Houbraken, J., de Vries, R.P. y Samson, R.A. (2014) «Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species», *Advances in Applied Microbiology*, 86, pp. 199–249.

Houbraken, J. y Samson, R.A. (2011) «Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families», *Studies in Mycology*, 70, pp. 1–51.

Huang, C., Chen, X., Li, J., Wu, F., Yang, W. y Zhang, J. (2016) «Responses of fungi community structure to the presence of pesticide chlorpyrifos in the soil planting *Brassica Juncea* (L.) Czerniak», *Water, Air, and Soil Pollution*, 227, p. 60. doi: 10.1007/s11270-016-2761-y.

Huber, D. (2012) Glyphosate hazards to crops, soils, animals, and consumers. Disponible en: <http://www.reduas.fcm.unc.edu.ar/wp-content/uploads/downloads/2012/01/USDA-scientist-reveals-all.f1-Don-Huber-original-ISI-ingles.pdf>.

Hubka, V., Nováková, A. y Kolarík, A. (2014) «Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. », *Mycology*, 7, pp. 169-208.

Hui, T. J., Ariffin, M. M. y Tahir, N. M. (2010) «Adsorption of formulated chlorpyrifos on

selected agricultural soils of Terengganu», *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 14(2), pp. 76-81.

Iannacone, J., Alvarino, L., Caballero, C. y Sánchez, J. (2000) «Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos», *Gayana (Concepción)*. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas., 64(2), pp. 139-146. doi: 10.4067/S0717-65382000000200003.

Ibáñez, M., Pozo, O. J., Sancho, J. V., López, F. J. y Hernández, F. (2005) «Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry», *Journal of Chromatography A*, 1081, pp. 145-155. doi: 10.1016/j.chroma.2005.05.041.

INTA. (2015). Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. 1a edición. Balcarce, Buenos Aires; Famaillá, Tucumán; Reconquista, Santa Fe. Ediciones INTA, 2015. Pp: 73.

INTA. (2017). Informe estadístico mercado de la soja. Disponible en: <http://inta.gob.ar/>. Fecha de acceso: diciembre 2017.

Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C. y Schulz, R. (2005) «Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina», *Chemosphere*, 61, pp. 817-826. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.036.

Jergentz, S., Pessacq, P., Mugni, H., Bonetto, C. y Schulz, R. (2004) «Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, pp. 133-141. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.007.

John, E. M. y Shaike, J. M. (2015) «Chlorpyrifos: pollution and remediation», *Environmental Chemistry Letters*. Springer International Publishing, 13(3), pp. 269-291. doi: 10.1007/s10311-015-0513-7.

Joseph, R., Reed, S., Jayachandran, K., Clark-Cuadrado, C. y Dunn, C. (2010) «Endosulfan has no adverse effect on soil respiration», *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 138, pp. 181-188. doi: 10.1016/j.agee.2010.04.017.

Karas, P. A., Perruchon, C., Exarhou, K., Ehaliotis, C. y Karpouzas, D. G. (2011) «Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi.», *Biodegradation*, 22, pp. 215-228. doi: 10.1007/s10532-010-9389-1.

Kengara, F. O., Schramm, K. W., Doerfler, U., Munch, J. C., Henkelmann, B., Welzl, G., Bernhoeft, S., Hense, B. y Schroll, R. (2010) «Degradation capacity of a 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing microbial community for traces of organochlorine pesticides», *Science of the Total Environment*, 408, pp. 3359-3366. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.04.009.

King, E.D., Bassi, A.B., Ross, D.C. y Druebbisch, B. (2011) «An industry perspective on the use of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* as biological control agents and the significance of cyclopiazonic acid», *Toxin Reviews*, 30, pp. 33-34.

Klich, M.A. (2002) «Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter», *Mycology*, 94, pp.21-27.

Knudsen, B. E., Ellegaard-Jensen, L., Albers, C. N., Rosendahl, S. y Aamand, J. (2013) «Fungal hyphae stimulate bacterial degradation of 2,6-dichlorobenzamide (BAM).», *Environmental Pollution*, 181, pp. 122-127. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.013.

Krzysko-Lupicka, T. y Orlik, A. (1997) «Use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide», *Chemosphere*, 34(12), pp. 2601-2605.

Krzysko-Lupicka, T., Strof, W., Kubs, K., Skorupa, M., Wieczorek, P., Lejczak, B. y Kafarski, P. (1997) «The ability of soil-borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, pp. 549-552.

Krzysko-Lupicka, T. y Sudol, T. (2008) «Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate.», *Chemosphere*, 71, pp. 1386-91. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.006.

Kulshrestha, G. y Kumari, A. (2011) «Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium* sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil», *Biology and Fertility of Soils*, 47, pp. 219-225. doi: 10.1007/s00374-010-0505-5.

Lallana, M. C., Lallana, V. H., Billard, C. E., Foti, M. N. y Elizalde, J. H. I. (2013) «Determinacion de reduccion del crecimiento radical (CE50) por una formulacion de glifosato



utilizando lechuga y trigo como especies bioindicadoras», *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCUIYO*, 45(1), pp. 143-151.

Lansden, J.A. y Davidson, J.I. (1983) «Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts», *Applied and Environmental Microbiology*, 45, pp. 766-769.

Larson, R. L., Hill, A. L., Fenwick, A., Kniss, A. R., Hanson, L. E. y Miller, S. D. (2006) «Influence of glyphosate on *Rhizoctonia* and *Fusarium* root rot in sugar beet», *Pest Management Science*, 62, pp. 1182-1192. doi: 10.1002/ps.

Latifi, A. M., Khondi, S., Mirzaei, M., Miresmaelli, M. y Babavalian, H. (2012) «Isolation and characterization of five chlorpyrifos degrading bacteria», *African Journal of Biotechnology*, 11(13), pp. 3140-3146. doi: 10.5897/AJB11.2814.

Leslie, J.F. y Summerell, B.A. (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa.

Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., Hu, Y., Wang, S. y Hu, S. (2016) «A study of organic acid production in contrast between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*», *Scientific Reports*, 6, pp. 25313.

Liu, K. L., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., Eichorst, S. A. y Xie, G. (2012) «Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes.», *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), pp. 1523-1533. doi: 10.1128/AEM.06826-11.

Lupi, L., Miglioranza, K. S. B., Aparicio, V. C., Marino, D., Bedmar, F. y Wunderlin, D. A. (2015) «Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina», *Science of the Total Environment*, 536, pp. 687-694. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.090.

Marino, D. y Ronco, A. (2005) «Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina», *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, pp. 820-826. doi: 10.1007/s00128-005-0824-7.

Marino, M.A., Chu, X. y Hantush, M.M. (2002). Pesticide transport modelling in soils, ground water and surface water. In: Schmitz, G.H. (Ed.), *Water Research and Environment Research. Proceedings of ICWRER*, vol. II. Dresden, Germany.

Mariyono, J. (2008), «Direct and indirect impacts of integrated pest management on pesticide use: A case of rice agriculture in Java, Indonesia». *Pest Management Science*, 64, pp.1069-1073.

Martínez, M.T., Cabrera, J.L. y Herrera, L. (2004) Las plantas transgénicas, una visión integral. e-Gnosis; 2: Artículo 2. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000202>

Martino, D., 1995. El herbicida glifosato: su manejo más allá de la dosis por hectárea. INIA La Estanzuela. Serie técnica N° 61.

Massiha, A., Reza, M., Khoshkholgh, M. y Issazadeh, K. (2011) «Microbial degradation of pesticides in surface soil using native strain in Iran», *International Conference on Biotechnology and Environment Management IPCBEE*, 18, pp. 76-81.

Maya, K., Upadhyay, S. N., Singh, R. S. y Dubey, S. K. (2012) «Degradation kinetics of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) by fungal communities.», *Bioresource Technology*, pp. 216-223. doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.003.

Merlin, C., Devers, M., Béguet, J., Boggio, B., Rouard, N. y Martin-Laurent, F. (2015) «Evaluation of the ecotoxicological impact of the organochlorine chlordane on soil microbial community structure, abundance, and function», *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), pp. 4185-4198. doi: 10.1007/s11356-015-4758-2.

Ministerio de agroindustria. Presidencia de la Nación. Dirección de estimaciones agrícolas y delegaciones. Disponible en: <http://www.agroindustria.gob.ar/>. Fecha de acceso: diciembre 2017.

Mohamed, A.T., El-Hussain, A.A., El-Siddig, M.A. y Osman, A.G. (2011) «Degradation of oxyfluorfen herbicide by soil microorganisms bio-degradation of herbicides», *Biotechnology*, 10(3), pp. 274-279.

Monsanto (2015). Disponible en: <http://www.monsanto.com/pages/default.aspx>. Fecha de acceso: diciembre 2017.

Monsanto (2018). Roundup Ultramax® Hoja de seguridad. Disponible en: <http://www.monsanto.com>. Fecha de acceso: enero 2018.

Moreira, F. y Siquiera, J., (2002). Xenobióticos no solo. En: Microbiología e Bioquímica do Solo, Moreira, F.M.S., Siquiera, J. O (Editores). Lavras: UFLA 243-284.

Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G. y Visconti, A. (2006) «Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes», *International Journal of*

*Food Microbiology*, 111, pp. 28-34. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.010.

Nawaz, K., Hussain, K., Choudary, N., Majeed, A., Ilyas, U., Ghani, A., Lin, F., Ali, K., Afghan, S., Raza, G. y Lashari, M. I. (2011) «Eco-friendly role of biodegradation against agricultural pesticides hazards», *African Journal of Microbiology Research*, 5(3), pp. 177-183. doi: 10.5897/AJMR10.375.

Nesci, A., Barros, G., Castillo, C. y Etcheverry, M. (2006) «Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina», *Soil and Tillage Research*, 91, pp. 143-149. doi: 10.1016/j.still.2005.11.014.

Nesci, A. y Etcheverry, M. (2002) «*Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina», *Letters in Applied Microbiology*, 34, pp. 343-348.

Newman, M. M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R. P., Liles, M. R., Ramsier, C. y Kloepper, J. W. (2016) «Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities», *Science of the Total Environment*. The Authors, 543, pp. 155-160. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.008.

Nicolas, V., Oestreicher, N. y Vélot, C. (2016) «Multiple effects of a commercial Roundup® formulation on the soil filamentous fungus *Aspergillus nidulans* at low doses: evidence of an unexpected impact on energetic metabolism», *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14), pp. 14393-14404. doi: 10.1007/s11356-016-6596-2.

Niu, J., Arentshorts, M., Nair, D. S., Dai, Z., Baker, S. E., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Punt, P. J. y Ram, A. F. (2015) «Identification of Classical Mutant in the Industrial Host *Aspergillus niger* by Systems Genetics: *LaeA* is Required for Acid Citric production and Regulates the Formation of some Secondary Metabolites», *G3: Genes, Genome, Genetics*, 6, pp.193-204.

Novas, M.V. y Cabral, D. (2002) «Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina», *Plant Disease*, 86, pp.215-219.

Nufarm (2018). Clorpirifós Nufarm® Hoja técnica. Disponible en: [www.nufarm.com](http://www.nufarm.com). Fecha de acceso: enero 2018

Obojska, A., Lejczak, B. y Kubrak, M. (1999) «Degradation of phosphonates by streptomycete isolates», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, pp. 872-876.

Omar, S. A. (1998) «Availability of phosphorus and sulfur or insecticide origin by fungi», *Biodegradation*, 9, pp. 327-336.

Peruzzo, P. J., Porta, A. A. y Ronco, A. E. (2008) «Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina.», *Environmental Pollution*, 156, pp. 61-66. doi: 10.1016/j.envpol.2008.01.015.

Peterson S.W. (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. En: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson R.A. y Pitt J.I. (Editores). Harwood Academic Publishers. Pp: 323-355.

Peterson, S. W. (2008) «Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci», *Mycologia*, 100(2), pp. 205-226.

Peterson, S. W., Varga, J., Frisvad, J. C., y Samson, R. A. (2008) «Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*», *Aspergillus in the Genomic Era*, pp. 33-56.

Piccolo, A., Celano, G. y Conte, P. (1996) «Adsorption of glyphosate by humic substances», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, pp.2442-2446.

Pildain, M. B., Cabral, D. y Vaamonde, G. (2005) «Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas en la Argentina, caracterización morfológica y toxigénica», *RIA*, 34(3), pp. 3-19.

Pildain, M. B., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. y Samson, R. A. (2008) «Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts.», *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, pp. 725-735. doi: 10.1099/ijs.0.65123-0.

Pildain, M. B., Vaamonde, G. y Cabral, D. (2004) «Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production», *International Journal of Food Microbiology*, 93, pp. 31-40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.007.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (2006) «Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts», *Mycopathologia*, 162, pp. 233-243.

Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009) *Fungi and food spoilage*. Tercera ed. Australia: Springer Dordrecht Heidelberg London New York. doi: 10.1007/978-0-387-92207-2.

Qureshi, A., Mohan, M., Kanade, G. S., Kapley, A. y Purohit, H. J. (2009) «*In situ* bioremediation of organochlorine-pesticide-contaminated microcosm soil and evaluation by gene

probe», *Pest Management Science*, 65, pp. 798-804. doi: 10.1002/ps.1757.

Pitt, J.I. y Taylor, J.W. (2014) «*Aspergillus*, its sexual states, and the new International Code of Nomenclature», *Mycology*, 106, pp. 1051–1052.

Prata, F., Camponez, V., Lvorenti, A., Tornisielo, V. y Borges, J. (2003) «Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels», *Scientia Agricola*, 60(1), pp.175-180.

Prata, F., Lavorenti, A., Regitano, J. y Tornisielo, V. (2000), «Influencia da material orgânica na sorcao e dessorcao do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos», *Revista Brasileira de Ciencias do Solo*, 24, pp. 947-951.

Pringle, A., Baker, D.M., Platt, J.L., Wares, J.P., Latge, J.P. y Taylor, J.W. (2005) «Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*», *Evolution*, 59, pp. 1886-1899.

Racke, K. D., Fontaine, D. D., Yoder, R. N. y Miller, J. R. (1994) «Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates», *Pesticide Science*, 42, pp. 43-51.

Racke, K. D., Steele, K. P., Yoder, R. N., Dick, W. A. y Avidov, E. (1996) «Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, pp. 1582-1592.

Rampoldi, E. A., Hang, S. y Barriuso, E. (2011) «The Fate of Glyphosate in Crop Residues», *Soil Science Society of America Journal*, 75, pp. 553-559. doi: 10.2136/sssaj2010.0105.

Reddy, K. N., Abbas, H. K., Zablotowicz, R. M., Abel, C. A. y Koger, C. H. (2007) «Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems.», *Food Additives and Contaminants*, 24(12), pp. 1367-73. doi: 10.1080/02652030701509964.

Reddy, K. N., Rimando, A. M. y Duke, S. O. (2004) «Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 5139-5143. doi: 10.1021/jf049605v.

Resnik, S.L., González, H. L., Pacin, A. M., Viora, M., Caballero, G. M. y Gros, E. G. (1996) «Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn», *Mycotoxin Research*, 12, pp.61-66.

Rivera Martínez, L., Goyal, M.R. y Crespo Ruiz, M. (2009). En: Capítulo II: Métodos para medir la humedad en el suelo. Manejo de riego por goteo. Apple Academic Press Inc.

Saito, M., Tsuruta, O., Siriacha, P., Kawasugi, S., Manabe, M. y Buangsuwon, D. (1986) «Distribution and aflatoxin production of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand», *Proceedings Japanese Association Mycotoxicology*, 24, pp. 41–46.

Samson, R.A., Hong, S. B., Peterson, S.W., Frisvad, J.C. y Varga, J. (2007) «Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*». *Studies in Mycology*, 59, pp. 147-207.

Samson, R.A., Hong, S-B. y Frisvad, J.C. (2006) «Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*», *Medical Mycology*, 44, pp. 133-148.

Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. y Andersen, B. (2010). Food and indoor fungi. Publisher: Utrecht, the Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G. y Frisvad, J. C. (2014) «Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*», *Studies in Mycology*, 78, pp. 141-173.

Samson, R.A. y Pitt, J.I. (2000). Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification. Harwood Academic Publishers.

Samson, R.A. y Varga, J. (2007) «*Aspergillus* systematics in the genomic era», *Studies in Mycology*, 59, pp. 201-206.

Sannino, F. y Gianfreda, L. (2001) «Pesticide influence on soil enzymatic activities», *Chemosphere*, 45, pp.417-425.

Sasikala, C., Jiwal, S., Rout, P. y Ramya, M. (2012) «Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil», *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, pp. 1301-1308. doi: 10.1007/s11274-011-0879-z.

Savitha, K. y Raman, D. N. S. (2012) «Isolation, identification, resistance profile and growth kinetics of chlorpyrifos resistant bacteria from agricultural soil of Bangalore», *Research in Biotechnology*, 3(2), pp. 8-13.

Sene, L., Converti, A., Secchi, G. A. R. y García-Simão, R. C. (2010) «New aspects on

atrazine biodegradation», *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(2), pp. 487-496. doi: 10.1590/S1516-89132010000200030.

Serrano-Silva, I., dos Santos, E. C., Ragagnin de Menezes, C., Fonseca de Faria, A., Franciscan, E., Grossman, M. y Durrant, L. R. (2009) «Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia», *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 100, pp. 4669-4675. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.079.

Shah, P. C., Kumar, V. R., Dastager, S. G. y Khire, J. M. (2017) «Phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 for a novel application to degrade organophosphorus pesticides», *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg, 7, p. 66. doi: 10.1186/s13568-017-0370-9.

Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D. y Sorenson, W. G. (1966) «Production of aflatoxin on rice.», *Applied Microbiology*, 14(3), pp. 425-428.

Shushkova, T., Ermakova, I. y Leontievsky, A. (2010) «Glyphosate bioavailability in soil.», *Biodegradation*, 21, pp. 403-410. doi: 10.1007/s10532-009-9310-y.

Silambarasan, S. y Abraham, J. (2013) «Ecofriendly method for bioremediation of chlorpyrifos from agricultural soil by novel fungus *Aspergillus terreus* JAS1», *Water, Air, and Soil Pollution*, 224, p. 1369. doi: 10.1007/s11270-012-1369-0.

Simon, D., Helliwell, S. y Robards, K. (1998) «Analytical chemistry of chlorpyrifos and diuron in aquatic ecosystems», *Analytica Chimica Acta*, 360, pp. 1-16.

Singh, B. K., Walker, A., Morgan, J. A. W. y Wright, D. J. (2003) «Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium», *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), pp. 5198-5206. doi: 10.1128/AEM.69.9.5198.

Singh, D. K. (2008) «Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: Concept, method and recent developments», *Indian Journal of Microbiology*, 48, pp. 35-40. doi: 10.1007/s12088-008-0004-7.

Sørensen, S. R., Schultz, A., Jacobsen, O. S. y Aamand, J. (2006) «Sorption, desorption and mineralisation of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles», *Environmental Pollution*, 141, pp. 184-194. doi: 10.1016/j.envpol.2005.07.023.

Sparks, D.L. (1996). Methods of soil analysis, Part 3. Chemical methods, Soil Science Society American Journal. Book series, no. 5, pp. 1201-1299 pp.

Surekha-Rani, M., Vijaya-Lakshmi, K., Suvarnalatha-Devi, P., Jaya-Madhuri, R., Aruna, S., Narasimha, G. y Venkateswarlu, K. (2008) «Isolation and characterization of a chlorpyrifos- degrading bacterium from agricultural soil and its growth response», *African Journal of Microbiology Research*, 2, pp. 26-31.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) «ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice», *Nucleic Acids Research*, 22, pp. 4673-4680.

Todorovic, G. R., Rampazzo, N., Mentler, A., Blum, W. E. H., Eder, A. y Strauss, P. (2014) «Influence of soil tillage and erosion on the dispersion of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in agricultural soils», *International Agrophysics*, 28(1), pp. 93-100. doi: 10.2478/intag-2013-0031.

Torres, L.R. y Osorio, A.G. (2012) «El Estado Actual del Proteoma de *Aspergillus*», *Biotecnología*, 16(2), pp. 115.

Trucksess, M.W., Stack, M.E., Nesheim, S., Albert, R. y Romer, T. (1994) «Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: collaborative study», *Journal of AOAC International*, 77, pp.1512-1521.

Tsitsigiannis, D. I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P. P. y Tjamos, E. C. (2012) «Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops», *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1), pp. 158-174. doi: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-9497.

United States Geological Survey (USGS) (2000). Organophosphorus Pesticide Occurrence and Distribution in Surface and Ground Water of the United States 1992-1997.

Vaamonde, G., Degrossi, C., Comerio, R., y Fernández Pinto, V. (1995) «*Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): Características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica», *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 30, pp.191-198.

Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernández-Pinto, V., Comerio, R. y Degrossi, C. (2003) «Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section flavi from different substrates in Argentina», *International Journal of Food Microbiology*, 88, pp. 79-84. doi:

10.1016/S0168-1605(03)00101-6.

Varga, J., Frisvad, J. C., y Samson, R. A. (2010) «*Aspergillus* section *Aeni* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi», *IMA Fungus*, 1, pp. 197–205.

Varga, J., Frisvad, J. C. y Samson, R. A. (2011) «Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*», *Studies in Mycology*, 69, pp. 57-80. doi: 10.3114/sim.2011.69.05.

Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M. y Samson, R.A. (2007) «*Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biserial black *Aspergillus* species with world-wide distribution», *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, pp. 1925-1932.

Veana, F., Aguilar, C. N., Viader Salvadó, J. M. y Rodríguez Herrera, R. (2011) «Invertasa de género *Aspergillus* y su impacto biotecnológico», *Biotecnología*, 15(1), pp. 11.

Villamil-Lepori, E. C., Bovi-Mitre, G. y Nassetta, M. (2013) «Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina», *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, pp. 25-43.

Walkley, A. y Black, C.A. (1965). Organic carbon. En: Black CA Eds. Methods of soil analysis. Monogr. 9. American Society of Agronomy. Madison, WI, USA, pp. 1372-1375

Wang, F., Dörfler, U., Schmid, M., Fischer, D., Kinzel, L. y Scherb, H. (2010) «Homogeneous inoculation vs. microbial hot spots of isolated strain and microbial community. What is the most promising approach in remediating 1,2,4-TCB contaminated soils?», *Soil Biochemistry*, 42, pp. 331-336.

Wardle, D. A. y Parkinson, D. (1992) «The influence of the herbicide glyphosate on interspecific interactions between four soil fungal species», *Mycological Research*. British Mycological Society, 96(3), pp. 180-186. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80963-5.

Way, M.J. y Van Emden, H.F. (2000) «Integrated pest management in practice pathways towards successful application», *Crop Protection*, 19, pp. 81-103.

Wu, X., Fu, G.M., Yin, W., Guode, D., Chan, Y., Luo, Y.F. y Wu, X. (2010) «Isolation and identification of glyphosate-degraded strain *Aspergillus oryzae* sp. A-F02 and its degradation characteristics», *Plant Diseases and Pests*, 1, pp.54-57.

Wuczkowski, M., Sterflinger, K., Kraus, G. F., Klug, B. y Prillinger, H. (2003) «Diversity of microfungi and yeasts in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen")», *Bodenkultur*, 54(2), pp. 109-117.

Xu, G., Li, Y., Zheng, W., Peng, X., Li, W. y Yan, Y. (2007) «Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp.», *Biotechnology Letters*, 29, pp. 1469-1473. doi: 10.1007/s10529-007-9444-0.

Yadav, M., Shukla, A. K., Srivastva, N., Upadhyay, S. N. y Dubey, S. K. (2015) «Utilization of microbial community potential for removal of chlorpyrifos: a review», *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), pp. 727-742. doi: 10.3109/07388551.2015.1015958.

Yadav, M., Srivastva, N., Shukla, A. K., Singh, R. S., Upadhyay, S. N. y Dubey, S. K. (2015) «Efficacy of *Aspergillus* sp. for degradation of chlorpyrifos in batch and continuous aerated packed bed bioreactors», *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), pp. 16-24. doi: 10.1007/s12010-014-1244-0.

Yang, X., Wang, F., Bento, C. P. M., Xue, S., Gai, L., van Dam, R., Mol, H., Ritsema, C. J. y Geissen, V. (2015) «Short-term transport of glyphosate with erosion in Chinese loess soil - A flume experiment», *Science of the Total Environment*, 512-513, pp. 406-414. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.071.

Yu, Y. L., Fang, H., Wang, X., Wu, X. M., Shan, M. y Yu, J. Q. (2006) «Characterization of a fungal strain capable of degrading chlorpyrifos and its use in detoxification of the insecticide on vegetables», *Biodegradation*, 17, pp. 487-494. doi: 10.1007/s10532-005-9020-z.

Zabaloy, M. C., Gomez, E., Garland, J. L. y Gomez, M. A. (2012) «Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate», *Applied Soil Ecology*, 61, pp. 333-339. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.12.004.

Zhang, J., Qin, J., Zhao, C., Liu, C., Xie, H. y Liang, S. (2015) «Response of bacteria and fungi in soil microcosm under the presence of pesticide endosulfan», *Water, Air, and Soil Pollution*, 226, p. 109. doi: 10.1007/s11270-015-2309-6.

Zhou, D. M., Wang, Y. J., Cang, L., Hao, X. Z. y Luo, X. S. (2004) «Adsorption and cosorption

of cadmium and glyphosate on two soils with different characteristics», *Chemosphere*, 57, pp. 1237-1244. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.08.043.

# **ANEXO ESTADÍSTICO**

## ANEXO ESTADÍSTICO

Este anexo contiene algunos de los tests a modo de ejemplo utilizados en el capítulo III para analizar los resultados de los ensayos en microcosmos.

### 1- Recuento de la microbiota nativa en presencia de glifosato

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
48	1329897,82	1329912,79	-664940,91	1329307,04

*AIC y BIC menores implica mejor*

#### Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos

	numDF	denDF	F-value	p-value
tratamiento	3	40	62824,92	<0,0001
CC	1	40	4239,39	<0,0001
tratamiento:CC	3	40	44510,74	<0,0001

#### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento\*CC

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	CC	PredLin	E.E.	Media	E.E.							
50	30	11,02	1,7E-03	61083,33	100,90	A						
10	30	11,01	1,7E-03	60333,33	100,28		B					
Control	70	10,91	1,7E-03	54750,00	95,52			C				
50	70	10,54	2,1E-03	37833,33	79,41				D			
10	70	10,51	2,1E-03	36833,33	78,35					E		
Control	30	10,04	2,7E-03	23000,00	61,91						F	
20	30	9,90	2,9E-03	19833,33	57,49							G
20	70	9,56	3,4E-03	14250,00	48,73							H



*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

## 1.2- Recuento de la microbiota nativa en presencia de glifosato en los distintos períodos muestreados

### Día 10 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	67725187496,35	<0,0001
tratamiento	3	29474687498,41	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	67725187500,97	<0,0001
tratamiento	3	29474687500,42	<0,0001

#### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	223500,00	0,58	A
10	33000,00	0,58	B
50	26500,00	0,58	C
20	17500,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### Día 10 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	73711687500,35	<0,0001
tratamiento	3	16161687500,08	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	73711687500,84	<0,0001
tratamiento	3	16161687500,18	<0,0001

### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.		
10	175000,00	0,58	A	
50	95000,00	0,58		B
Control	30000,00	0,58		C
20	13500,00	0,58		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 20 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	61347000000,85	<0,0001
tratamiento	3	12969000000,18	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	61347000000,96	<0,0001
tratamiento	3	12969000000,20	<0,0001

### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.		
50	140000,00	0,58	A	
10	115000,00	0,58		B
20	23000,00	0,58		C
Control	8000,00	0,58		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 20 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	9576749999,97	<0,0001
tratamiento	3	790250000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	9576749999,99	<0,0001
tratamiento	3	790250000,00	<0,0001

#### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
10	47500,00	0,58	A
Control	35000,00	0,58	B
50	19500,00	0,58	C
20	11000,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

#### Día 30 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	8111999999,98	<0,0001
tratamiento	3	201500000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	8112000000,00	<0,0001
tratamiento	3	201500000,00	<0,0001

#### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	36000,00	0,58	A
Control	29000,00	0,58	B
50	21500,00	0,58	C
20	17500,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	33708000000,14	<0,0001
tratamiento	3	6022500000,02	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	33708000000,40	<0,0001
tratamiento	3	6022500000,07	<0,0001

### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	120000,00	0,58	A
20	34500,00	0,58	B
Control	31500,00	0,58	C
10	26000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2106750000,00	<0,0001
tratamiento	3	64750000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2106750000,00	<0,0001
tratamiento	3	64750000,00	<0,0001

#### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	19500,00	0,58	A
Control	13500,00	0,58	B
10	11500,00	0,58	C
20	8500,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 40 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	26086687500,11	<0,0001
tratamiento	3	3715687500,02	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	26086687500,08	<0,0001
tratamiento	3	3715687500,01	<0,0001

#### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	90000,00	0,58	A
10	60000,00	0,58	B
20	23000,00	0,58	C
Control	13500,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2699999999,99	<0,0001
tratamiento	3	198500000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2700000000,00	<0,0001
tratamiento	3	198500000,00	<0,0001

### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	27000,00	0,58	A
20	13000,00	0,58	B
50	10500,00	0,58	C
10	9500,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

## Día 50 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	35,64	36,04	-12,82	0,91	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	4284858600,11	<0,0001
tratamiento	3	51898200,10	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	4284858600,10	<0,0001
tratamiento	3	51898200,10	<0,0001

**Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
50	21000,00	0,53	A
20	19499,67	0,53	B
10	16000,00	0,53	C
Control	12500,00	0,53	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )***Día 60 70 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2566687499,99	<0,0001
tratamiento	3	273687500,00	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2566687500,00	<0,0001
tratamiento	3	273687500,00	<0,0001

**Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	27500,00	0,58	A
10	16000,00	0,58	B
50	9000,00	0,58	C
20	6000,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )***Día 60 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**



	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	6279187500,00	<0,0001
tratamiento	3	300687500,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	6279187500,00	<0,0001
tratamiento	3	300687500,00	<0,0001

#### Recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	37500,00	0,58	A
50	21000,00	0,58	B
20	17500,00	0,58	C
Control	15500,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2- Recuento de los géneros más frecuentemente aislados

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma R2	0
144	524,35	594,04	-237,18	1,46	0,31

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	472,37	<0,0001
cc	1	4,8E-03	0,9450
generos	2	10,70	0,0001
glifosato	3	3,26	0,0240
cc:generos	2	4,30	0,0157
cc:glifosato	3	0,05	0,9844
generos:glifosato	6	1,18	0,3240
cc:generos:glifosato	6	1,10	0,3679

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	472,37	<0,0001
cc	1	4,8E-03	0,9450
generos	2	10,70	0,0001
glifosato	3	3,26	0,0240
cc:generos	2	4,30	0,0157
cc:glifosato	3	0,05	0,9844
generos:glifosato	6	1,18	0,3240
cc:generos:glifosato	6	1,10	0,3679

**LOG10\_recuento - Medias ajustadas y errores estándares para cc\*generos\*glifosato**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

cc	generos	glifosato	Medias	E.E.						
70	Aspergillus	0	3,76	0,60	A					
70	Aspergillus	50	3,68	0,60	A					
30	Aspergillus	0	3,55	0,60	A	B				
70	Penicillium	20	3,51	0,60	A	B				
30	Penicillium	0	3,47	0,60	A	B				
70	Aspergillus	20	3,37	0,60	A	B				
70	Penicillium	0	3,17	0,60	A	B	C			
30	Trichoderma	10	3,11	0,60	A	B	C			
70	Aspergillus	10	3,08	0,60	A	B	C	D		
70	Penicillium	10	3,02	0,60	A	B	C	D		
30	Penicillium	20	2,95	0,60	A	B	C	D		
70	Trichoderma	0	2,85	0,60	A	B	C	D		
30	Aspergillus	10	2,79	0,60	A	B	C	D		
70	Penicillium	50	2,76	0,60	A	B	C	D		
30	Aspergillus	20	2,71	0,60	A	B	C	D	E	
30	Trichoderma	20	2,58	0,60	A	B	C	D	E	
30	Aspergillus	50	2,47	0,60	A	B	C	D	E	
30	Penicillium	50	2,36	0,60	A	B	C	D	E	
30	Trichoderma	0	2,31	0,60	A	B	C	D	E	
30	Penicillium	10	1,88	0,60		B	C	D	E	
70	Trichoderma	10	1,58	0,60			C	D	E	F
30	Trichoderma	50	1,43	0,60				D	E	F
70	Trichoderma	20	1,05	0,60					E	F
70	Trichoderma	50	0,00	0,60						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3- Recuento de *Trichoderma* spp. en los distintos períodos muestreados

#### Día 10 70 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	26,01	26,40	-8,00	0,50	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

##### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	90750000,00	<0,0001
tratamiento	3	90750000,00	<0,0001

##### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	90750000,00	<0,0001
tratamiento	3	90750000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	5500,00	0,29	A
20	1,8E-12	0,29	B
10	0,00	0,29	B
50	0,00	0,29	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 10 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	507000000,00	<0,0001
tratamiento	3	57000000,00	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	507000000,00	<0,0001
tratamiento	3	57000000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
50	10000,00	0,58	A
10	10000,00	0,58	A
Control	5000,00	0,58	B
20	1000,00	0,58	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 20 70 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	26,01	26,40	-8,00	0,50	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3000000,00	<0,0001
tratamiento	3	3000000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3000000,00	<0,0001
tratamiento	3	3000000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	1000,00	0,29	A
Control	0,00	0,29	B
50	0,00	0,29	B
10	0,00	0,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 20 30 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	73500000,00	<0,0001
tratamiento	3	33500000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	73500000,00	<0,0001
tratamiento	3	33500000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	5000,00	0,41	A
10	2000,00	0,41	B
50	1,4E-12	0,41	C
20	0,00	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	64000000,00	<0,0001
tratamiento	3	8000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	64000000,00	<0,0001
tratamiento	3	8000000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	3000,00	0,50	A
10	3000,00	0,50	A
20	2000,00	0,50	B
50	1,4E-12	0,50	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2028000000,00	<0,0001
tratamiento	3	978000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2027999999,99	<0,0001
tratamiento	3	977999999,99	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	40000,00	0,58	A
10	6000,00	0,58	B
Control	3000,00	0,58	C
20	3000,00	0,58	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	26,01	26,40	-8,00	0,50	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3000000,00	<0,0001
tratamiento	3	3000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3000000,00	<0,0001
tratamiento	3	3000000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	1000,00	0,29	A
10	0,00	0,29	B
20	0,00	0,29	B
50	0,00	0,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
--	-------	---------	---------

(Intercept)	1	144000000,00	<0,0001
tratamiento	3	88000000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	144000000,00	<0,0001
tratamiento	3	88000000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	10000,00	0,50	A
20	1000,00	0,50	B
Control	1000,00	0,50	B
50	1,8E-12	0,50	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 50 70 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	37500000,00	<0,0001
tratamiento	3	21500000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	37500000,00	<0,0001
tratamiento	3	21500000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	4000,00	0,41	A
10	1000,00	0,41	B
50	0,00	0,41	C
20	0,00	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	26,01	26,40	-8,00	0,50	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3000000,00	<0,0001
tratamiento	3	3000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3000000,00	<0,0001
tratamiento	3	3000000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	1000,00	0,29	A
Control	0,00	0,29	B
50	0,00	0,29	B
10	0,00	0,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	13500000,00	<0,0001
tratamiento	3	5500000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	13500000,00	<0,0001
tratamiento	3	5500000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)



Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	2000,00	0,41	A
10	1000,00	0,41	B
50	0,00	0,41	C
20	0,00	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	37500000,00	<0,0001
tratamiento	3	21500000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	37500000,00	<0,0001
tratamiento	3	21500000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	4000,00	0,41	A
20	1000,00	0,41	B
Control	1,8E-12	0,41	C
50	1,4E-12	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 4- Recuento de *Aspergillus* spp. en los distintos períodos muestreados

### Día 10 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
--	-------	---------	---------

(Intercept)	1	2436750000,03	<0,0001
tratamiento	3	1442750000,02	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2436749999,99	<0,0001
tratamiento	3	1442750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	47000,00	0,58	A
10	6000,00	0,58	B
20	3000,00	0,58	C
50	1000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 10 30 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1690000000,00	<0,0001
tratamiento	3	83666666,67	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1690000000,00	<0,0001
tratamiento	3	83666666,67	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	10000,00	0,50	A
20	2000,00	0,50	B
Control	1000,00	0,50	C
50	3,6E-12	0,50	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 20 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	20418749999,80	<0,0001
tratamiento	3	11010749999,89	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	20418750000,01	<0,0001
tratamiento	3	11010750000,01	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
50	130000,00	0,58	A
10	30000,00	0,58	B
Control	4000,00	0,58	C
20	1000,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### Día 20 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	36000000,00	<0,0001
tratamiento	3	12000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	36000000,00	<0,0001
tratamiento	3	12000000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	4000,00	0,50	A
50	1000,00	0,50	B
20	1000,00	0,50	B
10	1,1E-12	0,50	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 30 70 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	126750000,00	<0,0001
tratamiento	3	12750000,00	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	126750000,00	<0,0001
tratamiento	3	12750000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	5000,00	0,58	A
50	5000,00	0,58	A
10	2000,00	0,58	B
20	1000,00	0,58	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 30 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	225000000,00	<0,0001
tratamiento	3	75666666,67	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	225000000,00	<0,0001
tratamiento	3	75666666,67	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	10000,00	0,50	A
20	3000,00	0,50	B
Control	2000,00	0,50	C
10	1,3E-12	0,50	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 40 70 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	90750000,00	<0,0001
tratamiento	3	14750000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	90750000,00	<0,0001
tratamiento	3	14750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	6000,00	0,58	A
50	2000,00	0,58	B
10	2000,00	0,58	B
Control	1000,00	0,58	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	9746999999,97	<0,0001
tratamiento	3	3260999999,99	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	9746999999,92	<0,0001
tratamiento	3	3260999999,97	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	70000,00	0,58	A
10	40000,00	0,58	B
Control	3000,00	0,58	C
20	1000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	81000000,00	<0,0001
tratamiento	3	9000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	81000000,00	<0,0001

tratamiento	3	9000000,00	<0,0001
-------------	---	------------	---------

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	3000,00	0,50	A
50	3000,00	0,50	A
20	3000,00	0,50	A
10	1,4E-12	0,50	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 50 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	256000000,00	<0,0001
tratamiento	3	120000000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	256000000,00	<0,0001
tratamiento	3	120000000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	12000,00	0,50	A
10	3000,00	0,50	B
50	1000,00	0,50	C
20	0,00	0,50	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 60 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	396750000,00	<0,0001
tratamiento	3	70750000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	396750000,00	<0,0001
tratamiento	3	70750000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	13000,00	0,58	A
10	4000,00	0,58	B
50	3000,00	0,58	C
20	3000,00	0,58	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 60 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3135999999,99	<0,0001
tratamiento	3	1853333333,33	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3136000000,00	<0,0001
tratamiento	3	1853333333,33	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	46000,00	0,50	A
Control	7000,00	0,50	B
20	3000,00	0,50	C
50	7,3E-12	0,50	D



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 5- Recuento de *Penicillium* spp. en los distintos períodos muestreados

### Día 10 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1518750000,01	<0,0001
tratamiento	3	386750000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1518750000,00	<0,0001
tratamiento	3	386750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	28000,00	0,58	A
10	8000,00	0,58	B
20	6000,00	0,58	C
50	3000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 10 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	400000000,00	<0,0001
tratamiento	3	77333333,33	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
--	-------	---------	---------

(Intercept)	1	400000000,00	<0,0001
tratamiento	3	77333333,33	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	10000,00	0,50	A
Control	7000,00	0,50	B
20	3000,00	0,50	C
50	5,5E-12	0,50	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 20 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	26,01	26,40	-8,00	0,50	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	192000000,00	<0,0001
tratamiento	3	192000000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	192000000,00	<0,0001
tratamiento	3	192000000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	8000,00	0,29	A
Control	1,4E-12	0,29	B
50	0,00	0,29	B
10	0,00	0,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 20 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	324000000,00	<0,0001
tratamiento	3	70666666,67	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	324000000,00	<0,0001
tratamiento	3	70666666,67	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	10000,00	0,50	A
50	5000,00	0,50	B
Control	3000,00	0,50	C
20	3,6E-12	0,50	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Día 30 70 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	300000000,00	<0,0001
tratamiento	3	22000000,00	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	300000000,00	<0,0001
tratamiento	3	22000000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	9000,00	0,58	A
Control	4000,00	0,58	B
50	4000,00	0,58	B

20	3000,00	0,58	C
----	---------	------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	484000000,00	<0,0001
tratamiento	3	78666666,67	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	484000000,00	<0,0001
tratamiento	3	78666666,67	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	10000,00	0,50	A
20	8000,00	0,50	B
Control	4000,00	0,50	C
10	1,1E-12	0,50	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	60750000,00	<0,0001
tratamiento	3	4750000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
--	-------	---------	---------

(Intercept)	1	60750000,00	<0,0001
tratamiento	3	4750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	4000,00	0,58	A
10	2000,00	0,58	B
20	2000,00	0,58	B
50	1000,00	0,58	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 40 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	121500000,00	<0,0001
tratamiento	3	41500000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	121500000,00	<0,0001
tratamiento	3	41500000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	5000,00	0,41	A
Control	4000,00	0,41	B
10	1,4E-12	0,41	C
50	0,00	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 50 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	90750000,00	<0,0001
tratamiento	3	8750000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	90750000,00	<0,0001
tratamiento	3	8750000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	5000,00	0,58	A
10	3000,00	0,58	B
20	2000,00	0,58	C
50	1000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 50 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	18750000,00	<0,0001
tratamiento	3	750000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	18750000,00	<0,0001
tratamiento	3	750000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	2000,00	0,58	A
Control	1000,00	0,58	B
20	1000,00	0,58	B
50	1000,00	0,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	126750000,00	<0,0001
tratamiento	3	4750000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	126750000,00	<0,0001
tratamiento	3	4750000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	5000,00	0,58	A
10	3000,00	0,58	B
50	3000,00	0,58	B
20	2000,00	0,58	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	81000000,00	<0,0001
tratamiento	3	11666666,67	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
--	-------	---------	---------

(Intercept)	1	81000000,00	<0,0001
tratamiento	3	11666666,67	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	4000,00	0,50	A
50	3000,00	0,50	B
Control	2000,00	0,50	C
10	1,0E-12	0,50	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6- Recuento de *Mucor* spp. en los distintos períodos muestreados

#### Día 10 70 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	6000000,00	<0,0001
tratamiento	3	2000000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	6000000,00	<0,0001
tratamiento	3	2000000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	1000,00	0,41	A
20	1000,00	0,41	A
Control	0,00	0,41	B
10	0,00	0,41	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 10 30 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor



**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	181500000,00	<0,0001
tratamiento	3	141500000,00	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	181500000,00	<0,0001
tratamiento	3	141500000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	10000,00	0,41	A
20	1000,00	0,41	B
Control	2,2E-12	0,41	C
10	1,4E-12	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Día 20 70 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2
12	164,58	164,98	-77,29	2886,32	0,90

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	64,02	<0,0001
tratamiento	3	24,01	0,0002

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	64,02	<0,0001
tratamiento	3	24,01	0,0002

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	16666,67	1666,42	A
50	10000,00	1666,42	B
Control	1,1E-11	1666,42	C

20	3,6E-12	1666,42	C
----	---------	---------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 20 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	24000000,00	<0,0001
tratamiento	3	8000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	24000000,00	<0,0001
tratamiento	3	8000000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	2000,00	0,41	A
10	2000,00	0,41	A
20	1,4E-12	0,41	B
50	1,1E-12	0,41	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	121500000,00	<0,0001
tratamiento	3	41500000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
--	-------	---------	---------

(Intercept)	1	121500000,00	<0,0001
tratamiento	3	41500000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	5000,00	0,41	A
20	4000,00	0,41	B
Control	0,00	0,41	C
10	0,00	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 30 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1518750000,00	<0,0001
tratamiento	3	494750000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1518750000,00	<0,0001
tratamiento	3	494750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	30000,00	0,58	A
Control	8000,00	0,58	B
20	6000,00	0,58	C
10	1000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 40 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	181500000,00	<0,0001
tratamiento	3	141500000,00	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	181500000,00	<0,0001
tratamiento	3	141500000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	10000,00	0,41	A
10	1000,00	0,41	B
Control	1,5E-12	0,41	C
20	0,00	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Día 40 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	4704000000,01	<0,0001
tratamiento	3	3504000000,01	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	4703999999,96	<0,0001
tratamiento	3	3503999999,97	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	50000,00	0,41	A
Control	6000,00	0,41	B
10	9,1E-12	0,41	C
20	2,3E-12	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	26,01	26,40	-8,00	0,50	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3000000,00	<0,0001
tratamiento	3	3000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3000000,00	<0,0001
tratamiento	3	3000000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	1000,00	0,29	A
10	0,00	0,29	B
Control	0,00	0,29	B
20	0,00	0,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	34,80	35,19	-12,40	0,87	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	729000000,00	<0,0001
tratamiento	3	137000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	729000000,00	<0,0001

tratamiento	3	137000000,00	<0,0001
-------------	---	--------------	---------

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	13000,00	0,50	A
20	10000,00	0,50	B
10	4000,00	0,50	C
Control	3,6E-12	0,50	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 60 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	31,55	31,95	-10,78	0,71	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	337500000,00	<0,0001
tratamiento	3	281500000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	337500000,00	<0,0001
tratamiento	3	281500000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	14000,00	0,41	A
20	1000,00	0,41	B
10	1,1E-12	0,41	C
Control	0,00	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 7- Recuento de *A. oryzae* AM1 en presencia de glifosato

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna1	48	0,23	0,10	8,86

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
------	----	----	----	---	---------

Modelo.	2,07	7	0,30	1,74	0,1277
cc	1,45	1	1,45	8,53	0,0057
tratamiento	0,43	3	0,14	0,85	0,4747
cc*tratamiento	0,18	3	0,06	0,36	0,7812
Error	6,82	40	0,17		
Total	8,89	47			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,48177**

Error: 0,1705 gl: 40

cc	tratamiento	Medias	n	E.E.		
30,00	Control	4,95	6	0,17	A	
30,00	10	4,93	6	0,17	A	
30,00	50	4,73	6	0,17	A	B
30,00	20	4,73	6	0,17	A	B
70,00	Control	4,66	6	0,17	A	B
70,00	20	4,54	6	0,17	A	B
70,00	10	4,40	6	0,17		B
70,00	50	4,35	6	0,17		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 7.1- Recuento de *A. oryzae* AM1 en presencia de glifosato en los distintos períodos muestreados

### Día 10 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	32136749999,84	<0,0001
tratamiento	3	646250000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	32136749999,92	<0,0001
tratamiento	3	646250000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.			
10	67000,00	0,58	A		
50	61500,00	0,58		B	
20	41000,00	0,58			C
Control	37500,00	0,58			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 10 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	45018749999,13	<0,0001
tratamiento	3	932749999,98	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	45018749999,52	<0,0001
tratamiento	3	932749999,99	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	77000,00	0,58	A
50	75000,00	0,58	B
10	52000,00	0,58	C
20	41000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 20 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	89268749999,48	<0,0001
tratamiento	3	14768749999,91	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	89268749999,12	<0,0001
tratamiento	3	14768749999,85	<0,0001



**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.			
10	180000,00	0,58	A		
Control	100000,00	0,58		B	
50	35000,00	0,58			C
20	30000,00	0,58			D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 20 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1472100749944,01	<0,0001
tratamiento	3	798364749969,63	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1472100750048,13	<0,0001
tratamiento	3	798364750026,10	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.			
10	1120000,00	0,58	A		
Control	164000,00	0,58		B	
20	80000,00	0,58			C
50	37000,00	0,58			D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 30 70 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7350750000,00	<0,0001
tratamiento	3	38750000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7350750000,01	<0,0001
tratamiento	3	38750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	30000,00	0,58	A
20	24000,00	0,58	B
Control	23000,00	0,58	C
10	22000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 30 30 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	27075000000,00	<0,0001
tratamiento	3	773000000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	27074999999,92	<0,0001
tratamiento	3	773000000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	67000,00	0,58	A
Control	52000,00	0,58	B
20	42000,00	0,58	C
50	29000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	12480749999,98	<0,0001
tratamiento	3	1208750000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	12480749999,96	<0,0001
tratamiento	3	1208750000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	50000,00	0,58	A
Control	49000,00	0,58	B
10	18000,00	0,58	C
50	12000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	45018750000,44	<0,0001
tratamiento	3	2580750000,03	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	45018750000,05	<0,0001
tratamiento	3	2580750000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	100000,00	0,58	A
50	65000,00	0,58	B
20	49000,00	0,58	C
10	31000,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 50 70 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2522999999,99	<0,0001
tratamiento	3	9449999999,99	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2523000000,00	<0,0001
tratamiento	3	945000000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	40000,00	0,58	A
20	13000,00	0,58	B
50	4000,00	0,58	C
10	1000,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 50 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30300749999,77	<0,0001
tratamiento	3	1968749999,98	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30300750000,03	<0,0001
tratamiento	3	1968750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	84000,00	0,58	A
50	54000,00	0,58	B
20	39000,00	0,58	C
10	24000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 60 70 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	40368000000,13	<0,0001
tratamiento	3	1028000000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	40367999999,80	<0,0001
tratamiento	3	1028000000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	85000,00	0,58	A
Control	53000,00	0,58	B
10	51000,00	0,58	C
50	43000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	117612000000,18	<0,0001
tratamiento	3	1354000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	117611999999,73	<0,0001
tratamiento	3	1354000000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	130000,00	0,58	A
Control	95000,00	0,58	B
20	88000,00	0,58	C
50	83000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 8- Recuento de AM1 en presencia de la microbiota a 70 CC

### 8.1- AM1

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
24	496,52	501,50	-243,26	38749,46	0,07	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	31,77	<0,0001
tratamiento	3	0,51	0,6829

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	31,77	<0,0001
tratamiento	3	0,51	0,6829

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	56500,00	15819,40	A
Control	50416,67	15819,40	A
20	40500,00	15819,40	A
50	30916,67	15819,40	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 8.2- Micobiota nativa

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2
24	508,78	513,76	-249,39	52647,85	0,08

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	11,17	0,0032
tratamiento	3	0,60	0,6238

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	11,17	0,0032
tratamiento	3	0,60	0,6238

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	54750,00	21493,39	A
50	37833,33	21493,39	A
10	36833,33	21493,39	A
20	14250,00	21493,39	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 9- Recuento de AM1 en presencia de la micobiota nativa a 70 CC en los distintos períodos muestrados

### 9.1- AM1

#### Día 10 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2
12	164,58	164,98	-77,29	2886,32	0,96

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3982,80	<0,0001
tratamiento	3	67,17	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3982,80	<0,0001
tratamiento	3	67,17	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	67000,00	1666,42	A
50	61500,00	1666,42	B
20	41000,00	1666,42	C
Control	40833,33	1666,42	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 20 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	89268749999,23	<0,0001
tratamiento	3	14768749999,87	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	89268749999,76	<0,0001
tratamiento	3	14768749999,96	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	180000,00	0,58	A



Control	100000,00	0,58	B	
50	35000,00	0,58		C
20	30000,00	0,58		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7350750000,00	<0,0001
tratamiento	3	38750000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7350750000,01	<0,0001
tratamiento	3	38750000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	30000,00	0,58	A
20	24000,00	0,58	B
Control	23000,00	0,58	C
10	22000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	12480749999,98	<0,0001
tratamiento	3	1208750000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	12480749999,96	<0,0001
tratamiento	3	1208750000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	50000,00	0,58	A
Control	49000,00	0,58	B
10	18000,00	0,58	C
50	12000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 50 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2522999999,98	<0,0001
tratamiento	3	944999999,99	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2523000000,00	<0,0001
tratamiento	3	945000000,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	40000,00	0,58	A
20	13000,00	0,58	B
50	4000,00	0,58	C
10	1000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 60 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	127,72	128,12	-58,86	288,24	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	487264,95	<0,0001
tratamiento	3	12253,61	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	487264,95	<0,0001
tratamiento	3	12253,61	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.			
20	85000,00	166,42	A		
Control	53000,00	166,42		B	
10	51000,00	166,42			C
50	43333,33	166,42			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 9.2- Micobiota

### Día 10 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	10755046875,02	<0,0001
tratamiento	3	277296875,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	10755046875,01	<0,0001
tratamiento	3	277296875,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.		
50	40250,00	0,58	A	
10	36000,00	0,58		B
20	22000,00	0,58		C
Control	21500,00	0,58		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 20 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	26790749999,88	<0,0001
tratamiento	3	3762249999,98	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	26790750000,09	<0,0001
tratamiento	3	3762250000,01	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.		
10	95000,00	0,58	A	
Control	53000,00	0,58		B
50	23500,00	0,58		C
20	17500,00	0,58		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	15877687500,03	<0,0001
tratamiento	3	4585187500,01	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	15877687500,05	<0,0001
tratamiento	3	4585187500,02	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	95000,00	0,58	A
Control	17500,00	0,58	B
20	17500,00	0,58	B
10	15500,00	0,58	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 40 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	4981687500,00	<0,0001
tratamiento	3	427187500,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	4981687499,98	<0,0001
tratamiento	3	427187500,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
20	31500,00	0,58	A
Control	29500,00	0,58	B
10	13000,00	0,58	C
50	7500,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 50 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
---	-----	-----	--------	-------	----	---

12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00
----	-------	-------	--------	------	------

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1485187500,00	<0,0001
tratamiento	3	168187500,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1485187500,00	<0,0001
tratamiento	3	168187500,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	22000,00	0,58	A
20	10000,00	0,58	B
10	7000,00	0,58	C
50	5500,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 60 70 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	10620750000,03	<0,0001
tratamiento	3	242750000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	10620749999,98	<0,0001
tratamiento	3	242750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.
-------------	--------	------

20	43000,00	0,58	A		
Control	27000,00	0,58		B	
10	26000,00	0,58			C
50	23000,00	0,58			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 10- Recuento de AM1 en presencia de la micobiota a 30 CC

### 10.1- AM1

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2
24	565,68	570,66	-277,84	218375,94	0,12

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	6,27	0,0211
tratamiento	3	0,93	0,4465

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	6,27	0,0211
tratamiento	3	0,93	0,4465

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher ( $\text{Alfa}=0,05$ )

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	237333,33	89151,60	A
Control	95333,33	89151,60	A
50	57166,67	89151,60	A
20	56500,00	89151,60	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 10.2- Micobiota nativa

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2
24	495,30	500,28	-242,65	37583,16	0,25

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	28,65	<0,0001

tratamiento	3	2,19	0,1205
-------------	---	------	--------

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	28,65	<0,0001
tratamiento	3	2,19	0,1205

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	61083,33	15343,26	A
10	60333,33	15343,26	A
Control	23000,00	15343,26	A
20	19833,33	15343,26	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 11- Recuento de AM1 en presencia de la micobiota nativa a 30 CC en los distintos períodos muestreados

#### 11.1- AM1

#### Día 10 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	45018749999,60	<0,0001
tratamiento	3	932749999,99	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	45018750000,24	<0,0001
tratamiento	3	932750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	77000,00	0,58	A
50	75000,00	0,58	B
10	52000,00	0,58	C
20	41000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



## Día 20 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1472100749982,77	<0,0001
tratamiento	3	798364749990,65	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1472100749986,67	<0,0001
tratamiento	3	798364749992,77	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	112000,00	0,58	A
Control	164000,00	0,58	B
20	80000,00	0,58	C
50	37000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	27075000000,00	<0,0001
tratamiento	3	773000000,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	27074999999,92	<0,0001
tratamiento	3	773000000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
10	67000,00	0,58	A
Control	52000,00	0,58	B
20	42000,00	0,58	C
50	29000,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 40 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	45018749999,75	<0,0001
tratamiento	3	2580749999,99	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	45018750000,05	<0,0001
tratamiento	3	2580750000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	100000,00	0,58	A
50	65000,00	0,58	B
20	49000,00	0,58	C
10	31000,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 50 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30300749999,77	<0,0001
tratamiento	3	1968749999,98	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30300750000,03	<0,0001
tratamiento	3	1968750000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	84000,00	0,58	A
50	54000,00	0,58	B
20	39000,00	0,58	C
10	24000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 60 30 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	117612000000,18	<0,0001
tratamiento	3	1354000000,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	117611999999,73	<0,0001
tratamiento	3	1354000000,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
10	130000,00	0,58	A
Control	95000,00	0,58	B
20	88000,00	0,58	C
50	83000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 11.2- Micobiota

### Día 10 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	19501171874,95	<0,0001
tratamiento	3	469171875,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	19501171875,04	<0,0001
tratamiento	3	469171875,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
50	52000,00	0,58	A
Control	50250,00	0,58	B
10	29500,00	0,58	C
20	29500,00	0,58	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 20 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	393132000010,45	<0,0001
tratamiento	3	198345500005,27	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	393132000000,89	<0,0001
tratamiento	3	198345500000,45	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.			
10	565000,00	0,58	A		
Control	85500,00	0,58		B	
20	45500,00	0,58			C
50	28000,00	0,58			D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 30 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	10442999999,99	<0,0001
tratamiento	3	176500000,00	<0,0001

**Pruebas de hipótesis secuenciales**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	10443000000,00	<0,0001
tratamiento	3	176500000,00	<0,0001

**recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento***LSD Fisher (Alfa=0,05)**Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.			
10	38000,00	0,58	A		
Control	33500,00	0,58		B	
20	25500,00	0,58			C
50	21000,00	0,58			D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Día 40 30 CC****Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor***Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	14179687499,93	<0,0001
tratamiento	3	565687500,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	14179687500,00	<0,0001
tratamiento	3	565687500,00	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	51000,00	0,58	A
50	36000,00	0,58	B
20	33000,00	0,58	C
10	17500,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 50 30 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	20542687499,73	<0,0001
tratamiento	3	4540687499,94	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	20542687499,90	<0,0001
tratamiento	3	4540687499,98	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
Control	99000,00	0,58	A
50	30000,00	0,58	B
20	21500,00	0,58	C
10	15000,00	0,58	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
12	37,10	37,49	-13,55	1,00	1,00	

*AIC y BIC menores implica mejor*

### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	33549187499,97	<0,0001
tratamiento	3	266187500,00	<0,0001

### Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	33549187500,03	<0,0001
tratamiento	3	266187500,00	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	Medias	E.E.	
10	66500,00	0,58	A
50	51000,00	0,58	B
Control	49000,00	0,58	C
20	45000,00	0,58	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

## 12- Recuento de *A. oryzae* AM2 en presencia de clorpirifós y la microbiota nativa

### 12.1- AM2

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
48	4127998,70	4128013,67	-2063991,35	4127311,63

*AIC y BIC menores implica mejor*

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			47	6289202,74	
clorpirifos	3	673943,69	44	5615259,06	<0,0001
CC	1	1200018,01	43	4415241,04	<0,0001
clorpirifos:CC	3	287929,42	40	4127311,63	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos\*CC

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

clorpirifos	CC	PredLin	E.E.	Media	E.E.														
10	30	13,01	6,1E-04	447500,00	273,10	A													
50	30	12,99	6,2E-04	435833,33	269,52		B												
20	30	12,39	8,3E-04	239250,00	199,69			C											
50	70	12,34	8,5E-04	229666,67	195,65				D										
0	30	12,31	8,7E-04	222500,00	192,57					E									
0	70	12,13	9,5E-04	184833,33	175,51						F								
10	70	11,91	1,1E-03	148583,33	157,37							G							
20	70	11,89	1,1E-03	146250,00	156,12									H					

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*



## Día 10 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	179,35	181,29	-85,67	3,7E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1218525,83	
clorpirifos	3	1218525,83	8	3,7E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
50	13,30	7,5E-04	595000,00	445,35	A		
10	12,61	1,1E-03	300000,00	316,23		B	
0	12,04	1,4E-03	170000,00	238,05			C
20	11,81	1,6E-03	135000,00	212,13			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 10 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	182,46	184,40	-87,23	3,2E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1154738,37	
clorpirifos	3	1154738,37	8	3,2E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
20	13,20	7,9E-04	540000,00	424,26	A		
50	13,06	8,4E-04	470000,00	395,81		B	
10	13,03	8,6E-04	455000,00	389,44			C
0	11,51	1,8E-03	100000,00	182,57			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 20 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	179,46	181,40	-85,73	3,2E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	103081,95	
clorpirifos	3	103081,95	8	3,2E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	12,64	1,0E-03	310000,00	321,46	A		
50	12,52	1,1E-03	275000,00	302,77		B	
0	12,51	1,1E-03	270000,00	300,00			C
20	12,13	1,3E-03	185000,00	248,33			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 20 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	183,79	185,73	-87,89	2,3E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	683424,38	
clorpirifos	3	683424,38	8	2,3E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
50	13,39	7,1E-04	655000,00	467,26	A		
0	12,74	9,9E-04	340000,00	336,65		B	
10	12,71	1,0E-03	330000,00	331,66			C
20	12,41	1,2E-03	245000,00	285,77			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	170,27	172,21	-81,13	8,9E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1022974,48	
clorpirifos	3	1022974,48	8	8,9E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
50	12,75	9,8E-04	345000,00	339,12	A			
20	12,10	1,4E-03	180000,00	244,95		B		
0	11,15	2,2E-03	69500,00	152,21			C	
10	10,74	2,7E-03	46000,00	123,83				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	177,69	179,63	-84,84	4,9E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1608873,90	
clorpirifos	3	1608873,90	8	4,9E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
50	13,25	7,6E-04	570000,00	435,89	A			
10	12,81	9,6E-04	365000,00	348,81		B		
0	11,92	1,5E-03	150000,00	223,61			C	
20	11,23	2,1E-03	75500,00	158,64				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	174,15	176,08	-83,07	6,9E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1764023,17	
clorpirifos	3	1764023,17	8	6,9E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
0	13,15	8,0E-04	515000,00	414,33	A			
20	12,59	1,1E-03	295000,00	313,58		B		
10	11,16	2,2E-03	70000,00	152,75			C	
50	11,13	2,2E-03	68000,00	150,55				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	178,97	180,91	-85,48	3,5E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	469523,39	
clorpirifos	3	469523,39	8	3,5E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
50	12,83	9,4E-04	375000,00	353,55	A			
10	12,78	9,7E-04	355000,00	344,00		B		
20	12,07	1,4E-03	175000,00	241,52			C	
0	11,95	1,5E-03	155000,00	227,30				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	159,12	161,06	-75,56	1,7E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	34388,77	
clorpirifos	3	34388,77	8	1,7E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	11,13	2,2E-03	68500,00	151,11	A		
50	10,74	2,7E-03	46000,00	123,83		B	
0	10,63	2,8E-03	41500,00	117,62			C
20	10,52	3,0E-03	37000,00	111,06			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	178,95	180,89	-85,48	3,4E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	172796,54	
clorpirifos	3	172796,54	8	3,4E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	12,68	1,0E-03	320000,00	326,60	A		
0	12,52	1,1E-03	275000,00	302,77		B	
50	12,45	1,1E-03	255000,00	291,55			C

20	11,98	1,4E-03	160000,00	230,94	D
----	-------	---------	-----------	--------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	161,08	163,02	-76,54	1,5E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	91178,21	
clorpirifos	3	91178,21	8	1,5E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	11,48	1,9E-03	97000,00	179,81	A		
50	10,80	2,6E-03	49000,00	127,80		B	
20	10,73	2,7E-03	45500,00	123,15			C
0	10,67	2,8E-03	43000,00	119,72			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	183,93	185,87	-87,96	2,4E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1552930,00	
clorpirifos	3	1552930,00	8	2,4E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	13,66	6,2E-04	860000,00	535,41	A		
0	12,66	1,0E-03	315000,00	324,04		B	
50	12,58	1,1E-03	290000,00	310,91			C
20	12,39	1,2E-03	240000,00	282,84			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 13- Recuento de AM2 en presencia de la micobiota a 70 CC

#### 13.1- AM2

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
24	2716048,11	2716052,82	-1358020,05	2715714,96

*AIC y BIC menores implica mejor*

##### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			23	2866688,43	
clorpirifos	3	150973,47	20	2715714,96	<0,0001

##### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
50	12,34	8,5E-04	229666,67	195,65	A			
0	12,13	9,5E-04	184833,33	175,51		B		
10	11,91	1,1E-03	148583,33	157,37			C	
20	11,89	1,1E-03	146250,00	156,12				D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

#### 13.2- Micobiota nativa

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
24	1001543,10	1001547,81	-500767,55	1001219,41

*AIC y BIC menores implica mejor*

##### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			23	2001888,03	
clorpirifos	3	1000668,63	20	1001219,41	<0,0001

##### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
20	12,32	8,6E-04	225166,67	193,72	A			
10	11,66	1,2E-03	115500,00	138,74		B		
0	11,33	1,4E-03	83166,67	117,73			C	
50	10,49	2,2E-03	35833,33	77,28				D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

## 14- Recuento de AM2 en presencia de la micobiota nativa a 70 CC en los distintos períodos muestreados

### 14.1- AM2

#### Día 10 70 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	179,35	181,29	-85,67	3,7E-05

*AIC y BIC menores implica mejor*

##### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1218525,83	
clorpirifos	3	1218525,83	8	3,7E-05	<0,0001

##### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
50	13,30	7,5E-04	595000,00	445,35	A
10	12,61	1,1E-03	300000,00	316,23	B
0	12,04	1,4E-03	170000,00	238,05	C
20	11,81	1,6E-03	135000,00	212,13	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

#### Día 20 70 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	179,46	181,40	-85,73	3,2E-05

*AIC y BIC menores implica mejor*

##### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	103081,95	
clorpirifos	3	103081,95	8	3,2E-05	<0,0001

##### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
10	12,64	1,0E-03	310000,00	321,46	A
50	12,52	1,1E-03	275000,00	302,77	B
0	12,51	1,1E-03	270000,00	300,00	C



20	12,13	1,3E-03	185000,00	248,33	D
----	-------	---------	-----------	--------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	170,27	172,21	-81,13	8,9E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1022974,48	
clorpirifos	3	1022974,48	8	8,9E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
50	12,75	9,8E-04	345000,00	339,12	A		
20	12,10	1,4E-03	180000,00	244,95		B	
0	11,15	2,2E-03	69500,00	152,21			C
10	10,74	2,7E-03	46000,00	123,83			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	174,15	176,08	-83,07	6,9E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1764023,17	
clorpirifos	3	1764023,17	8	6,9E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
0	13,15	8,0E-04	515000,00	414,33	A		
20	12,59	1,1E-03	295000,00	313,58		B	
10	11,16	2,2E-03	70000,00	152,75			C

50	11,13	2,2E-03	68000,00	150,55	D
----	-------	---------	----------	--------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	159,12	161,06	-75,56	1,7E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	34388,77	
clorpirifos	3	34388,77	8	1,7E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	11,13	2,2E-03	68500,00	151,11	A		
50	10,74	2,7E-03	46000,00	123,83		B	
0	10,63	2,8E-03	41500,00	117,62			C
20	10,52	3,0E-03	37000,00	111,06			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	161,08	163,02	-76,54	1,5E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	91178,21	
clorpirifos	3	91178,21	8	1,5E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	11,48	1,9E-03	97000,00	179,81	A		
50	10,80	2,6E-03	49000,00	127,80		B	
20	10,73	2,7E-03	45500,00	123,15			C
0	10,67	2,8E-03	43000,00	119,72			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 14.2- Micobiota

### Día 10 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	170,91	172,85	-81,46	8,3E-05

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	712690,88	
clorpirifos	3	712690,88	8	8,3E-05	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
20	12,58	1,1E-03	290000,00	310,91	A			
10	12,18	1,3E-03	195000,00	254,95		B		
0	11,51	1,8E-03	100000,00	182,57			C	
50	10,68	2,8E-03	43500,00	120,42				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 20 70 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	164,58	166,52	-78,29	1,3E-04

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	378974,71	
clorpirifos	3	378974,71	8	1,3E-04	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
10	12,10	1,4E-03	180000,00	244,95	A			
20	11,30	2,0E-03	81000,00	164,32		B		
0	10,93	2,4E-03	56000,00	136,63			C	
50	10,51	3,0E-03	36500,00	110,30				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	171,51	173,45	-81,76	8,8E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1903497,14	
clorpirifos	3	1903497,14	8	8,8E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
20	13,16	8,0E-04	520000,00	416,33	A			
0	12,04	1,4E-03	170000,00	238,05		B		
10	11,31	2,0E-03	82000,00	165,33			C	
50	10,63	2,8E-03	41500,00	117,62				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	161,90	163,84	-76,95	1,5E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	96119,10	
clorpirifos	3	96119,09	8	1,5E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
20	11,33	2,0E-03	83000,00	166,33	A			
10	11,30	2,0E-03	81000,00	164,32		B		
0	11,01	2,3E-03	60500,00	142,01			C	
50	10,31	3,3E-03	30000,00	100,00				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	161,90	163,84	-76,95	1,5E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	96119,10	
clorpirifos	3	96119,09	8	1,5E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
20	11,33	2,0E-03	83000,00	166,33	A			
10	11,30	2,0E-03	81000,00	164,32		B		
0	11,01	2,3E-03	60500,00	142,01			C	
50	10,31	3,3E-03	30000,00	100,00				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 70 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	165,94	167,88	-78,97	1,4E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1131038,78	
clorpirifos	3	1131038,78	8	1,4E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
20	12,68	1,0E-03	320000,00	326,60	A			
10	11,41	1,9E-03	90000,00	173,21		B		
0	11,03	2,3E-03	61500,00	143,18			C	
50	10,18	3,5E-03	26500,00	93,99				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 15- Recuento de AM2 en presencia de la micobiota a 30 CC

### 15.1- AM2

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
24	1411950,59	1411955,30	-705971,30	1411596,66

*AIC y BIC menores implica mejor*

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			23	2222496,30	
clorpirifos	3	810899,64	20	1411596,66	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
10	13,01	6,1E-04	447500,00	273,10	A
50	12,99	6,2E-04	435833,33	269,52	B
20	12,39	8,3E-04	239250,00	199,68	C
0	12,31	8,7E-04	222500,00	192,57	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### 15.2- Micobiota nativa

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
24	766123,28	766127,99	-383057,64	765799,34

*AIC y BIC menores implica mejor*

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			23	1174878,89	
clorpirifos	3	409079,55	20	765799,34	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
10	12,10	9,6E-04	179333,33	172,88	A
0	11,44	1,3E-03	93333,33	124,72	B
20	11,39	1,4E-03	88166,67	121,22	C
50	11,03	1,6E-03	62000,00	101,65	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

## 16- Recuento de AM2 en presencia de la micobiota nativa a 30 CC en los distintos períodos muestreados

### 16.1- AM2

#### Día 10 30 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	182,46	184,40	-87,23	3,2E-05

AIC y BIC menores implica mejor

##### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1154738,37	
clorpirifos	3	1154738,37	8	3,2E-05	<0,0001

##### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
20	13,20	7,9E-04	540000,00	424,26	A		
50	13,06	8,4E-04	470000,00	395,81		B	
10	13,03	8,6E-04	455000,00	389,44			C
0	11,51	1,8E-03	100000,00	182,57			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Día 20 30 CC

##### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	183,79	185,73	-87,89	2,3E-05

AIC y BIC menores implica mejor

##### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	683424,38	
clorpirifos	3	683424,38	8	2,3E-05	<0,0001

##### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
50	13,39	7,1E-04	655000,00	467,26	A		
0	12,74	9,9E-04	340000,00	336,65		B	

10	12,71	1,0E-03	330000,00	331,66	C
20	12,41	1,2E-03	245000,00	285,77	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	177,69	179,63	-84,84	4,9E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1608873,90	
clorpirifos	3	1608873,90	8	4,9E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
50	13,25	7,6E-04	570000,00	435,89	A		
10	12,81	9,6E-04	365000,00	348,81		B	
0	11,92	1,5E-03	150000,00	223,61			C
20	11,23	2,1E-03	75500,00	158,64			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	178,97	180,91	-85,48	3,5E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	469523,39	
clorpirifos	3	469523,39	8	3,5E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
50	12,83	9,4E-04	375000,00	353,55	A		
10	12,78	9,7E-04	355000,00	344,00		B	
20	12,07	1,4E-03	175000,00	241,52			C



0	11,95	1,5E-03	155000,00	227,30	D
---	-------	---------	-----------	--------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	178,95	180,89	-85,48	3,4E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	172796,54	
clorpirifos	3	172796,54	8	3,4E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	12,68	1,0E-03	320000,00	326,60	A		
0	12,52	1,1E-03	275000,00	302,77		B	
50	12,45	1,1E-03	255000,00	291,55			C
20	11,98	1,4E-03	160000,00	230,94			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	183,93	185,87	-87,96	2,4E-05

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1552930,00	
clorpirifos	3	1552930,00	8	2,4E-05	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.			
10	13,66	6,2E-04	860000,00	535,41	A		
0	12,66	1,0E-03	315000,00	324,04		B	
50	12,58	1,1E-03	290000,00	310,91			C
20	12,39	1,2E-03	240000,00	282,84			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 16.2- Micobiota

### Día 10 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	172,48	174,42	-82,24	5,8E-05

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	109986,52	
clorpirifos	3	109986,52	8	5,8E-05	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
50	12,10	1,4E-03	180000,00	244,95	A			
10	12,07	1,4E-03	175000,00	241,52		B		
20	11,88	1,5E-03	145000,00	219,85			C	
0	11,42	1,9E-03	91000,00	174,16				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Día 20 30 CC

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	164,16	166,10	-78,08	1,5E-04

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1268249,90	
clorpirifos	3	1268249,90	8	1,5E-04	<0,0001

#### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
10	12,68	1,0E-03	320000,00	326,60	A			
20	11,14	2,2E-03	69000,00	151,66		B		
0	10,65	2,8E-03	42000,00	118,32			C	
50	10,24	3,5E-03	28000,00	96,61				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 30 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	164,16	166,10	-78,08	1,5E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	1268249,90	
clorpirifos	3	1268249,90	8	1,5E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
10	12,68	1,0E-03	320000,00	326,60	A			
20	11,14	2,2E-03	69000,00	151,66		B		
0	10,65	2,8E-03	42000,00	118,32			C	
50	10,24	3,5E-03	28000,00	96,61				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 40 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	169,75	171,69	-80,88	1,2E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	762425,31	
clorpirifos	3	762425,31	8	1,2E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
0	12,47	1,1E-03	260000,00	294,39	A			
10	12,28	1,2E-03	214999,67	267,71		B		
20	11,56	1,8E-03	105000,00	187,08			C	
50	10,26	3,4E-03	28500,00	97,47				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 50 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	164,45	166,39	-78,22	1,2E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	310221,44	
clorpirifos	3	310221,44	8	1,2E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
10	12,04	1,4E-03	170000,00	238,05	A			
20	11,10	2,2E-03	66500,00	148,88		B		
0	10,85	2,5E-03	51500,00	131,02			C	
50	10,80	2,6E-03	49000,00	127,80				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Día 60 30 CC

### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
12	165,34	167,28	-78,67	1,0E-04

AIC y BIC menores implica mejor

### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			11	27622,64	
clorpirifos	3	27622,64	8	1,0E-04	<0,0001

### recuento - Medias ajustadas y errores estándares para clorpirifos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

clorpirifos	PredLin	E.E.	Media	E.E.				
10	11,49	1,8E-03	98000,00	180,74	A			
20	11,37	2,0E-03	87000,00	170,29		B		
0	11,18	2,2E-03	71500,00	154,38			C	
50	11,05	2,3E-03	63000,00	144,91				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

